

Bioproses adalah proses untuk menghasilkan suatu produk dengan menggunakan konsep-konsep utama berupa bioteknologi, biologi, dan teknik rekayasa proses. Teknologi bioproses adalah teknologi yang berkaitan dengan segala operasi dan proses yang memanfaatkan organisme baik dalam fase hidup, maupun produk enzimnya untuk menghasilkan suatu produk



*Tentang*

**Hadiyanto & Maulana Azim**

Dr Hadryanto lahir di Pematang, 28 Oktober 1975 Pendidikan S1 ditempuh di jurusan Teknik Kimia UNDIP (1998) dan dilanjutkan studi S2 di Food and Bioprocess Engineering, Wageningen University, Netherlands (2003) dan S3 di departemen yang sama di Wageningen University pada tahun 2007. Pengalaman penelitiannya dilanjutkan dengan 2 tahun postdoctoral di Process intensification group, TUDELFT Netherlands (2007-2009).

Berbagai penelitian telah dilakukan dengan grant dan Hibah DIKTI (Hibah bersaing, Kompetensi, Strategi Nasional, Hibah kerjasama Internasional), Deptan (KKP3T), DIPA UNDIP dan kerjasama Internasional yang tertuang dalam publikasi Jurnal nasional dan internasional. Saat ini Hadiyanto tercatat sebagai anggota organisasi profesi di nasional (PATPI, Indonesian Biotechnology Consortium, BKK-PII) dan forum internasional (Sustainable Energy and Environment-SEE Forum). Hadiyanto juga saat ini menduduki ketua Center of Biomass and Renewable Energy (CBI) dan sebagai editor in chief international Journal of Renewable Energy Development (UREO) dengan ISSN: 2252-4940

M M Azimatun Nur, lahir di Semarang, 29 Oktober 1988 dia adalah alumnus S1 dan S2 Teknik Kimia UNDIP Saat ini bekerja di CV Tirtatech Engineering sebagai associate director, sebuah perusahaan yang bergerak di bidang air limbah, biomass dan energi terbarukan Selain itu dia bekerja

sebagai konsultan teknis untuk CV Nealgae Technology, sebuah perusahaan yang memproduksi Spirulina. Karir kepenulisannya dimulai sejak SMA selaku tim redaksi majalah sekolah. Saat kuliah, dia ditunjuk menjadi redaksi majalah SOL (Science on fne) Forum Studi Teknik UNDIP

Selain menulis buku dan jurnal, dia aktif menulis cerpen yang beberapa karyanya sempat dimuat di majalah nasional, serta satu karya novel berjudul Magi.

# Dasar-Dasar Bioproses

Hadiyanto  
& Maulana Azim

ISBN 978-602-0962-11-5





# **DASAR-DASAR BIOPROSES**

*Edisi Pertama*

**Hadiyanto  
& Maulana Azim**

**Address:** Center of Biomass and Renewable Energy (C-BIORE)  
UPT Tower Lab Terpadu Lantai 4.  
Jl Prof Soedarto, S.H. Tembalang Semarang 50275



**CV EF Press Digimedia**

# **DASAR-DASAR BIOPROSES**

© EF Press Digimedia 2016  
Hak Cipta dilindungi oleh Undang-undang  
Cetakan Pertama, 170 x 250 mm, 118 hal +XX

**Penulis:**

**Hadiyanto  
& Maulana Azim**

Diterbitkan oleh:  
EF Press Digimedia  
Jl. Pondok Bukit Agung C-5 Semarang  
Email: efpressdigimedia@gmail.com

Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak memperbanyak penggunaan untuk kepentingan komersial suatu program komputer dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)

## KATA PENGANTAR

Kami mengucapkan puji syukur ke hadirat Allah SWT atas diterbitkannya buku ini. Buku Dasa-Dasar Bioproses ini merupakan edisi pertama sebagai buku ajar untuk mata kuliah dengan nama yang sama yaitu Dasar-Dasar Bioproses. Tujuan diterbitkannya buku ini adalah agar mahasiswa mendapatkan gambaran yang jelas mengenai teori dan aplikasi dalam hal yang berkaitan dengan bioteknologi untuk proses kimia.

Di dalam buku ini akan diberikan topic-topik mengenai prinsip dasar bioproses, teknologi dan reaksi enzimatik, imobilisasi sel dan enzim, fermentasi, perancangan reactor dan aplikasi bioproses untuk produk-produk di kehidupan sehari-hari.

Kami menyadari masih terdapat kekurangan dalam buku ini untuk itu kritik dan saran terhadap penyempurnaan buku ini sangat diharapkan. Semoga buku ini dapat memberi manfaat bagi mahasiswa yang sedang mendalami teori bioproses khususnya dan bagi semua pihak yang membutuhkan.

Semarang, 2015

Penyusun

Hadiyanto dan MM Azimatun Nur





DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL..... I

PRAKATA ..... III

DAFTAR ISI.....

DAFTAR TABEL..... V

IX

DAFTAR GAMBAR ..... XI

BAB I     PENGERTIAN BIOPROSES ..... 1

           Bioteknologi ..... 1

           Teknik Biokimia ..... 3

           Bioproses ..... 5

           .....

BAB II     ENZIMATIK ..... 8

           Pendahuluan ..... 8

           Aplikasi Komersial Enzim ..... 9

           Kinetika Enzim Sederhana ..... 10

           Evalukasi Parameter Kinetik ..... 18

           Penghambat pada Reaksi Enzimatis ..... 25

           Pengaruh Lain pada Aktivitas Enzim ..... 29

BAB III    IMOBILISASI ENZIM ..... 33

           Teknik Imobilisasi ..... 34

           Efek Transfer Massa ..... 37

           Kinetika Orde Nol ..... 41

           Kinetika Orde Satu ..... 43

           Kinetika Michaelis Menten ..... 46

	Difusivitas Efektif dalam Gel Biologis .....	47
BAB IV	PERTUMBUHAN SEL .....	51
	Fase Pertumbuhan Sel .....	51
	Pengamatan Pertumbuhan Sel .....	53
	Kinetika Pertumbuhan Sel .....	38
BAB V	FERMENTASI .....	65
	Sejarah Fermentasi .....	67
	Komponen Proses Fermentasi .....	68
	Proses Fermentasi .....	71
	Faktor Berpengaruh dalam Fermentasi .....	72
	Kondisi Fermentasi berdasarkan Nutrien .....	73
	Kebutuhan Nutrisi Sel .....	74
BAB VI	DESAIN BIOREAKTOR .....	79
	Tipe Bioreaktor .....	80
	Desain Reaktor untuk Sel .....	87
	Desain Reaktor untuk Enzim .....	94
	Contoh Problem .....	97
	Scale up Bioreaktor .....	101
BAB VII	APLIKASI FERMENTASI PADA MAKANAN .....	63
	Manfaat Makanan Fermentasi .....	103
	Keju .....	105
	Saeurkraut .....	108
	Kecap .....	113
	DAFTAR PUSTAKA .....	118

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Aplikasi bioteknologi ..... 2

Tabel 1.2. Produk bioproses ..... 7

Tabel 2.1. Pemodelan komputer SAS NLINE..... 23

Tabel 3.1. Difusivitas efektif larutan dalam gel ..... 47

Tabel 4.1. Fase pertumbuhan sel berdasarkan laju spesifik ..... 53

Tabel 4.2. Contoh data hubungan OD vs biomassa mikroalga ..... 54

Tabel 4.3. Nilai Ks beberapa mikroorganisme ..... 60

Tabel 5.1. Pembagian proses fermentasi ..... 71

Tabel 5.2. Proses fermentasi kontinyu ..... 72

Tabel 5.3. Elemen nutrien dan fungsinya untuk mikroorganisme ..... 75

Tabel 6.1. Parameter scale up bioreaktor ..... 102

Tabel 7.1. Sejarah industri makanan fermentasi ..... 104

Tabel 7.2. Contoh produk keju dan tahun penemuan ..... 105

Tabel 7.3. Kondisi awal substrat sayuran fermentasi sauerkraut ..... 109

Tabel 7.4. Faktor berpengaruh pada fermentasi sauerkraut ..... 111

Tabel 7.5. Perubahan komposisi Sauerkraut ..... 112

Tabel 7.6. Perubahan parameter sauerkraut hari ke-1 dan ke-23 ..... 113





## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1. Skema bioproses secara umum .....	3
Gambar 2.1. Perubahan konsentrasi produk dan substrat vs t .....	10
Gambar 2.2. Efek konsentrasi substrat pada awal kecepatan reaksi .....	11
Gambar 2.3. Teori gembok senyawa kompleks substrat enzim.....	12
Gambar 2.4. Plot Langmuir .....	19
Gambar 2.5. Plot Lineweaver Burk .....	20
Gambar 2.6. Plot Eadie Hofstee .....	20
Gambar 2.7. Plot data contoh 2.2. ....	23
Gambar 2.8. Kurva kecepatan reaksi .....	24
Gambar 2.9. Efek penghambat .....	27
Gambar 2.10. Kontrol pH optimum .....	29
Gambar 3.1. Perbedaan produksi enzim terimobilisasi .....	36
Gambar 3.2. Diagram skema substrat bereaksi dengan enzim terimobilisasi .....	38
Gambar 3.3. Neraca substrat dalam enzim terimobilisasi .....	41
Gambar 3.4. Profil konsentrasi substrat, prediksi radial .....	45
Gambar 3.5. Efek modulus Thiele .....	46
Gambar 3.6. Model difusi imobilisasi enzim .....	48
Gambar 4.1. Fase pertumbuhan sel .....	51
Gambar 4.2. Contoh hubungan OD vs biomassa .....	56
Gambar 4.3. Hubungan konsentrasi substrat vs laju pertumbuhan .....	60
Gambar 5.1. Skema fermentasi .....	68
Gambar 6.1. Bioreaktor konvensional .....	80
Gambar 6.2. Vessel reaktor bergelembung .....	83
Gambar 6.3. Reaktor airlift .....	85
Gambar 6.4. Skema reaktor packed bed .....	86

Gambar 6.5.	Skema operasi reaktor unggun fluidisasi .....	87
Gambar 6.6.	Hubungan laju pengenceran, konsentrasi, dan laju produksi .....	93
Gambar 6.7.	Komponen dimensi reaktor .....	94
Gambar 7.1.	Proses pemisahan dadih dari whey .....	108
Gambar 7.3.	Proses pembuatan saeurkraut .....	113



# **BAB I**

---

## **PENGERTIAN BIOPROSES**

Banyak produk yang ada di sekitar kita, mulai dari produk pangan, obat-obatan, produk energi, produk kimia, hingga proses penguraian limbah organik tidak lepas dari peran bioproses. Disadari atau tidak, nenek moyang kita telah lama menggunakan konsep-konsep bioproses untuk memproduksi makanan atau minuman, seperti tempe, kecap, tape, dan beberapa produk pangan lain. Seiring perkembangan jaman, proses-proses lebih dikembangkan, konsep-konsep bioproses telah banyak disempurnakan secara sistematis untuk menunjang proses produksi, menekan biaya, meningkatkan yield dan konversi, serta menekan terjadinya resiko selama proses produksi.

Bioproses adalah proses untuk menghasilkan suatu produk dengan menggunakan konsep-konsep utama berupa bioteknologi, biologi, dan teknik rekayasa proses. Teknologi bioproses adalah teknologi yang berkaitan dengan segala operasi dan proses yang memanfaatkan organisme baik dalam fase hidup, maupun produk enzimnya untuk menghasilkan suatu produk. Bioproses tidak hanya membahas mengenai teori bagaimana membuat suatu produk dengan menggunakan mikroorganisme. Lebih luas lagi, teknik bioproses memegang kendali dalam desain bioreaktor, studi fermentasi, kondisi operasi, kualitas produk, keamanan produk, dan penunjang produksi lain. Ilmu dalam bioproses memegang peran penting mulai dari skala laboratorium, hingga skala pabrikan, mulai dari rekayasa genetika sel mikroorganismenya, hingga rekayasa proses produksinya.

### **1.1. Bioteknologi**

Bioteknologi merupakan “teknologi yang berkaitan dengan teknik komersial untuk memproduksi, atau memodifikasi suatu produk, dengan menggunakan organisme hidup, atau substrat dari organisme, termasuk di dalamnya dapat berupa peningkatan karakteristik organisme . . .” (Congres of Biotechnology, 1984). Dalam kurun tahun akhir-akhir ini, makna bioteknologi lebih bergeser, yang umumnya digunakan untuk proses yang berhubungan dengan mikroorganisme, menjadi teknik rekayasa sel organisme seperti rekombinasi DNA dan penggabungan sel.

## ***Dasar-dasar Bioproses***

Rekombinasi DNA berkaitan dengan manipulasi genetika sel yang berguna untuk mengembangkan mikroorganisme, di mana mikroorganisme tersebut memungkinkan untuk menghasilkan produk baru. Teknologi skala laboratorium untuk memanipulasi genetika dengan menggunakan sel hidup juga dapat disebut sebagai rekayasa genetika. Tujuan utama dari teknik ini adalah menyilangkan gen asing dalam bentuk DNA ke dalam sel, dan sel tersebut dimasukkan lagi ke dalam organisme, sehingga diperoleh produk yang sesuai dengan keinginan.

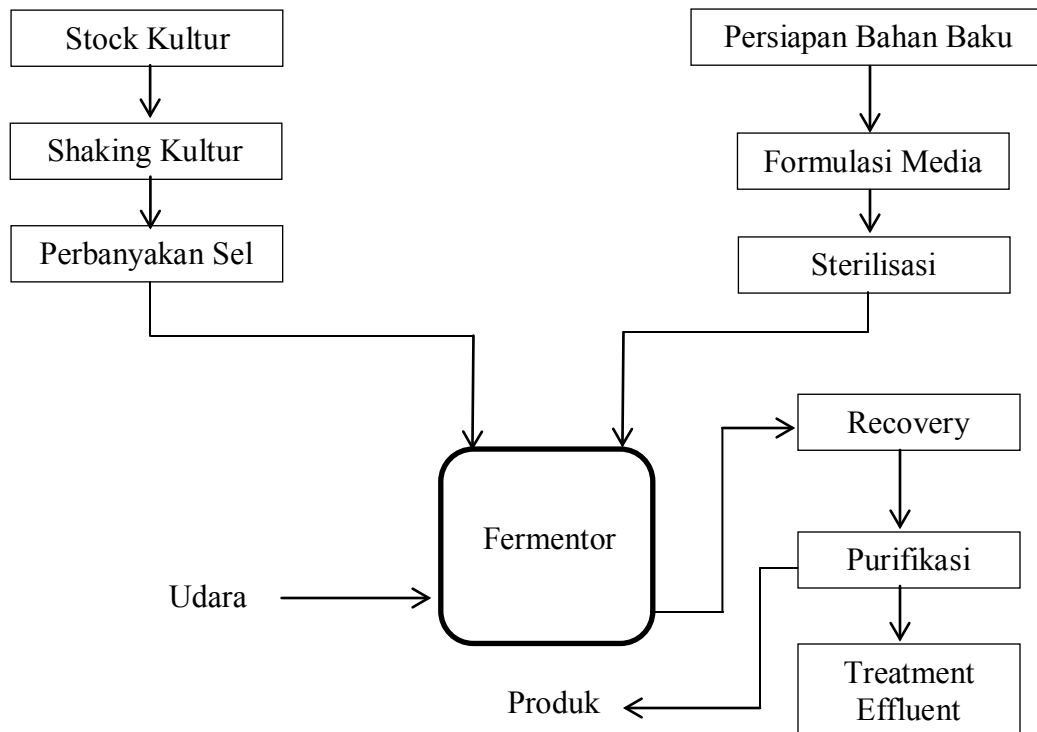
Lain halnya dengan metode penggabungan sel, metode ini bertujuan untuk menghasilkan sel hybrid tunggal, yang diperoleh dari penggabungan dua sel berbeda sehingga diperoleh sel yang sesuai keinginan. Sebagai contoh, sebuah sel khusus dari sistem imun dapat memproduksi zat antibody. Namun sel tersebut memiliki kelemahan di bagian laju pertumbuhannya. Di lain hal, beberapa sel tumor memiliki laju pertumbuhan yang cepat dan memiliki masa hidup yang lama. Dengan menggabungkan dua sel tersebut akan diperoleh sel hibrida yang unggul. Beberapa aplikasi lain dari bioteknologi tersaji pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1. Aplikasi bioteknologi

<b>Area</b>	<b>Produk dan Aplikasi</b>
<b>Farmasi</b>	Antibiotik, hormon, serum, insulin, interferon, interleukins, dll
<b>Peternakan</b>	Pengembangan hewan ternak yang unggul
<b>Pertanian</b>	Transfer sel yang bersifat pestisida, herbisida, ke spesies tanaman, pengembangan tanaman untuk meningkatkan fotosintesis, penyerapan nitrogen, pengembangan biopestisida, dll
<b>Produk Kimia Adhi</b>	Asam amino, enzim, vitamin, lipid, biopolimer, bioplastik.
<b>Aplikasi Lingkungan</b>	Degradasi racun, recovery minyak bumi.
<b>Bahan Kimia Umum</b>	Asam asetat, aseton, butanol, ethanol, dan biomassa lain
<b>Bioelektronik</b>	Biochip, biosensor, biorobotika

## 1.2. Teknik Biokimia

Pada sub bab sebelumnya telah dijelaskan mengenai pentingnya peran bioteknologi dalam bidang industri. Namun demikian, kesuksesan rekombinasi DNA dan penggabungan sel tidak akan sukses jika tidak ditopang oleh metode lain jika proses tersebut akan diterapkan dalam skala yang lebih besar. Komersialisasi produk ini memerlukan metode lain untuk proses scale up dan perhitungan visibilitas ekonomi. Untuk mengubah operasi skala laboratorium menjadi skala lapangan, kita tidak mungkin hanya mengubah ukuran vessel menjadi lebih besar. Dalam skala laboratorium, diperlukan 200 mL Erlenmeyer dalam proses reaksi. Namun dalam skala lapangan, kita tidak mungkin langsung membuatnya dalam skala 2000 L, kita tidak mungkin melakukan pengadukan, dan resiko yang ditimbulkan juga akan semakin besar. Kita memerlukan desain bioreaktor yang efektif dalam proses tersebut. Teknik yang berhubungan dengan rekayasa proses dan desain produksi yang berhubungan dengan kimia dan biologi disebut biokimia. Teknik ini diperlukan untuk mengkomersialisasikan bioteknologi.



Gambar 1.1. Skema Bioproses secara Umum



## ***Dasar-dasar Bioproses***

Untuk mengetahui lebih lanjut mengenai peran insinyur biokimia, kita dapat melihat ilustrasi bioproses yang melibatkan sel dalam Gambar 1.1. Raw material, biasanya biomassa, diolah dan dicampur dengan bahan lain yang diperlukan untuk sel sebagai medium tumbuh. Campuran cairan, medium, disterilisasi untuk mengeliminasi semua mikroorganisme hidup. Vessel dan peralatan lain juga diperlukan sterilisasi sebelum dilakukan proses produksi. Dalam proses produksinya, biasanya digunakan bioreaktor atau fermentor yang dilengkapi dengan agitator, bafel, sparger udara, dan beberapa sensor kontrol untuk mengetahui dan menjaga kondisi operasi. Strain mikroorganisme yang steril dimasukkan ke dalam vessel. Jumlah sel akan mulai berkembang biak secara eksponensial setelah melewati masa adaptasi hingga akhirnya menyentuh level maksimum seiring berkurangnya substrat pada medium. Fermentasi dihentikan dan isi dari vessel akan dipompa keluar untuk recovery produk dan purifikasi. Proses ini dapat dijalankan baik secara batch atau kontinyu.

Dutta (2008) berpendapat, dalam menjalankan bioproses ini, insinyur teknik kimia akan bekerja bersama sama dengan ilmuwan biologi:

1. untuk menghasilkan katalis biologis terbaik (mikroorganisme, sel hewan, tumbuhan, atau enzim) untuk proses yang diinginkan
2. untuk membuat lingkungan terbaik bagi katalis agar menghasilkan performa terbaiknya dengan melakukan desain bioreaktor dan mengoperasikannya secara efisien
3. Untuk memisahkan produk yang diinginkan dari campuran reaksi dengan metode yang ekonomis.

Proses-proses tersebut tidak akan lepas dari peran serta insinyur teknik kimia dalam mendesain dan mengembangkan rekayasa proses. Hanya saja dalam hal ini diperlukan campur tangan disiplin ilmu lain untuk keberlangsungan dan kesuksesan bioproses.

Beberapa pertanyaan mendasar selama pengembangan proses produksi di antaranya:

1. Perubahan apa yang mungkin terjadi?  
Lintas disiplin ilmu diperlukan untuk menjawab pertanyaan ini, setidaknya salah satu dari ilmu-ilmu disiplin harus dikuasai, meliputi: mikrobiologi, biokimia,

biologi molekuler, genetika, dan sebagainya. Insinyur bioproses membutuhkan disiplin ilmu ini agar lebih baik dalam menjalankan proses produksi.

2. Seberapa cepat proses akan berjalan?

Kecepatan proses produksi berkaitan dengan biaya produksi yang akan dikeluarkan. Kinetika reaksi berperan penting dalam mengetahui sejauh apa reaksi akan berjalan dan efek apa yang mungkin ditimbulkan meliputi kondisi fisik dan kimia. Dalam hal ini, seorang yang expert di bidang rekayasa proses diperlukan dalam proses produksi untuk mengetahui kinetika kimia dan desain reaktor yang sesuai. Teknik yang sama juga dapat diterapkan dengan enzim atau kinetika sel. Untuk mendesain bioreaktor yang efektif, diperlukan data mengenai kecepatan reaksi yang dipengaruhi oleh berbagai kondisi operasi, termasuk di dalamnya termodinamika, fenomena perpindahan, interaksi biologis, stabilitas klon, permindahan panas, dan sebagainya.

3. Bagaimana sistem dioperasikan dan dikontrol untuk yield yang maksimum?

Untuk kontrol dan kondisi operasi yang maksimum, diperlukan peralatan seperti sensor dan alat kontrol yang *reliable*. Terkadang perlu dilakukan simulasi komputer untuk mengetahui kondisi optimum dari rekayasa bioproses tersebut untuk mendapatkan titik yang paling ekonomis dan efisien.

4. Bagaimana produk dipisahkan dengan kemurnian maksimum dan biaya yang minimum?

Untuk bagian ini, proses hilir, insinyur teknik kimia berperan lebih banyak dalam memilih dan mengembangkan berbagai teknik pemisahan yang umum dipelajari dalam teknik kimia seperti distilasi, absorpsi, ekstraksi, adsorpsi, drying, filtrasi, presipitasi, dan leaching. Banyak metode juga telah dikembangkan dalam pemisahan dalam bioproses namun masih dalam bentuk laboratorium seperti kromatografi, elektroforesis, dan dialisis. Teknik tersebut dimungkinkan untuk dikembangkan lebih jauh lagi sehingga dapat diaplikasikan dalam skala industri besar.

### **1.3. Bioproses**

Aplikasi industri bioproses umumnya menggunakan sel hidup untuk menghasilkan perubahan kimia atau fisik agar sesuai keinginan. Proses biologis memiliki kelebihan dan kekurangan dibanding industri teknik kimia tradisional. Beberapa kelebihannya di antaranya:

1. Kondisi operasi yang standard. Kondisi reaksi untuk bioproses adalah standar. Secara umum hanya diperlukan suhu kamar, tekanan atmosfer, dan pH netral. Sebagai hasilnya didapatkan fasilitas pabrik yang lebih sederhana dan kecelakaan kerja yang minim dibanding pabrik kimia.
2. Spesifik. Katalis enzim umumnya memiliki spesifikasi yang tinggi dan bereaksi dengan satu reaksi kimia. Banyaknya varietas enzim memungkinkan produk yang dihasilkan semakin banyak dan beragam.
3. Efektivitas. Kecepatan katalis enzim biasanya lebih cepat dari katalis non biologis. Kebutuhan konsentrasi enzim lebih kecil.
4. Sumber terbarukan. Material baru untuk bioproses adalah biomassa yang keberadaannya sangat luas.
5. Rekombinan teknologi DNA. Perkembangan rekombinan DNA memungkinkan proses biologis lebih baik

Beberapa kekurangan:

1. Hasil produksi kompleks. Terkadang produk memiliki kontaminan seperti sel lain, banyak terjadi metabolisme hasil samping, dan terkadang terjadi reaksi enzimatik yang tidak diinginkan.
2. Kondisi lingkungan yang encer. Komponen dari produk komersial biasanya diproduksi dalam jumlah terbatas dalam medium cair. Oleh karena itu separasi menjadi mahal. Karena umumnya produk bioproses memiliki sensitivitas tinggi terhadap panas, maka separasi tradisional tidak bisa diterapkan. Diperlukan metode separasi yang lebih baik dan lebih modern.
3. Kontaminasi. Sistem fermentor dapat terkontaminasi dengan mudah, karena banyak bakteri dan jamur yang tumbuh di lingkungan sekitar. Problem umum

yang sering dihadapi adalah pertumbuhan sel menjadi lambat karena adanya kontaminan.

4. Variabilitas. Sel lebih cenderung bermutasi karena perubahan lingkungan dan terjadi perubahan karakteristik sel. Selain itu reaksi enzimatik lebih sensitif dan tidak stabil, serta terkadang membutuhkan penanganan khusus.

Namun demikian, bioproses masih tetap menjadi teknik dalam produksi yang keberadaannya cenderung tidak bisa digantikan oleh teknik lain karena beberapa hal seperti yield yang tinggi, keefektifan proses, dan faktor ekonomis. Beberapa produk yang sering ditemui dapat dilihat pada Tabel 1.2.

Tabel 1.2. Produk Bioproses (Pauline, 1995)

<b>Produk bioproses</b>	<b>Organisme</b>	<b>Kebutuhan (kg/tahun)</b>	<b>dunia</b>
<b>Ethanol</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2 \times 10^{10}$	
<b>Butanol</b>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	$2 \times 10^6$	
<b>Single cell protein</b>	<i>Pseudomonas methylotrophus</i>	$0,5-1 \times 10^8$	
<b>Asam sitrat</b>	<i>Aspergillus niger</i>	$2-3 \times 10^8$	
<b>Asam Laktat</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	$2 \times 10^7$	
<b>D-sorbitol</b>	<i>Acetobacter suboxydans</i>	$4 \times 10^7$	
<b>Penisilin</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	$3-4 \times 10^7$	
<b>Tetrasilin</b>	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	$1 \times 10^7$	
<b>Gum xanthan</b>	<i>Xanthomonas campestris</i>	$5 \times 10^7$	
<b>Enzim</b>	<i>Bacillus sp, A.niger, B.coagulans, dll</i>	$1 \times 10^4 - 6 \times 10^5$	
<b>Vitamin B12</b>	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	$1 \times 10^4$	

## BAB II

---

### ENZIMATIK

#### 2.1. Pendahuluan

Enzim adalah katalis biologis yang tersusun dari molekul protein di alam. Enzim diproduksi oleh sel hidup (hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme). Hampir setiap reaksi di dalam sel tersebut, membutuhkan keberadaan enzim. Fungsi utama dalam sistem di alam, katalis enzim digunakan untuk mempercepat proses pembentukan atau penguraian ikatan kimia.

Kemampuan katalis dari enzim ini lebih disebabkan oleh struktur proteinnya (Dutta, 2008). Reaksi enzimatik juga berbeda dari reaksi kimia seperti:

1. Katalis enzim memiliki selektivitas yang tinggi, dan beraksi hanya dengan satu atau beberapa reaksi kimia, sehingga meminimalisasi hasil samping.
2. Kecepatan reaksi enzim lebih cepat dari reaksi yang menggunakan katalis nonbiologis. Hanya dibutuhkan sedikit konsentrasi enzim untuk memperoleh hasil yang diinginkan.
3. Kondisi operasi untuk enzim relatif mudah dan umum.
4. Enzim lebih sensitif atau tidak stabil sehingga membutuhkan penanganan khusus

Penamaan enzim umumnya non deskriptis seperti:

*renin* enzim dalam pembuatan keju

*pepsin* penghidrolisis protein pada pH asam

*trypsin* menghidrolisis protein pada pH basa

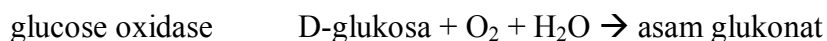
namun seiring perkembangan jaman, penamaan enzim lebih diperhatikan dengan penambahan akhiran *-ase* pada nama substrat yang berhubungan dengan fungsinya atau berdasarkan reaksi katalisnya.

Nama substrat + *ase*

$\alpha$ -amylase      pati       $\rightarrow$       glukosa + maltosa + oligosakarida

<i>lactase</i>	laktosa	→	glukosa + galaktosa
<i>lipase</i>	lipid	→	asam lemak + gliserol
<i>maltase</i>	maltosa	→	glukosa
<i>urease</i>	urea + H <sub>2</sub> O	→	2NH <sub>3</sub> + CO <sub>2</sub>

Reaksi yang berhubungan dengan katalisnya + *ase*



Seiring semakin banyaknya enzim yang ditemukan, maka diperlukan pembakuan nama agar tidak terjadi ambiguisasi dalam masyarakat. Pada tahun 1964 Komisi Enzim Internasional mulai menangani penamaan enzim dan regulasinya. Penamaan enzim dikategorikan ke dalam enam golongan bergantung ada tipe reaksi kimia. Setiap kategori memiliki sub kategori, subsub kategori, dan subsubsub kategori. Maka dari itu terkadang kita dapat menemui penamaan enzim dengan adanya penomoran. Seperti contoh enzim alkohol dehidrogenase dapat dinamai dengan penomoran 1.1.1.1.

## **2.2. Aplikasi Komersial Enzim**

Enzim telah lama digunakan sejak nenek moyang kita tanpa disadari, tanpa adanya pembakuan serta ilmu pengetahuan mengenainya. Mereka membuat oncom, yoghurt, keju, dan kecap tanpa tahu bahwa di sana terdapat reaksi enzimatik. Pada tahun 1980an, komersialisasi enzim mulai tenar, yakni saat penggunaan ekstrak sel fungi yang digunakan untuk mengubah pati menjadi gula (Eveleigh, 1981).

Enzim umumnya diproduksi oleh mikroorganisme yang ditumbuhkan pada kultur murni atau dapat diperoleh langsung dari tumbuhan atau hewan. Enzim yang diproduksi secara komersial ini dapat diklasifikasikan ke dalam tiga kategori (Crueger dan Crueger, 1984):

1. Enzim industrial, seperti amilase, protease, glukosa isomerase, lipase, katalase, dan penicilin acylase

2. Enzim analitis, seperti glukosa oksidase, galaktosa oksidase, hexokinase, muramidase, dan kolesterol oksidase
3. Enzim medis, seperti asparaginase, protease, lipase, dan streptokinase.

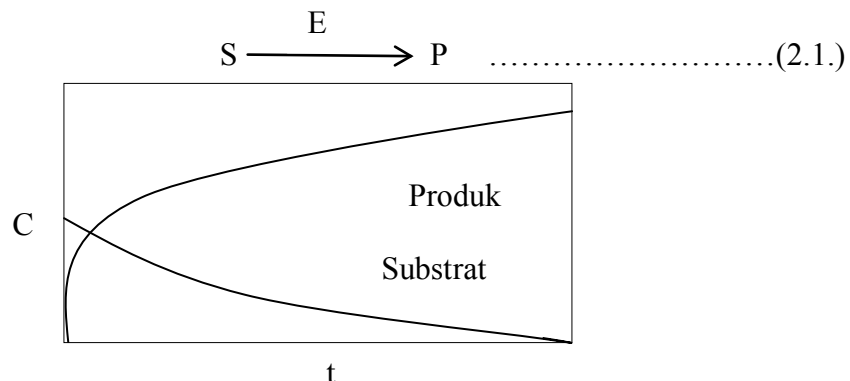
Contoh umum enzim komersial adalah pada industri sirup. Enzim  $\alpha$ -amilase, glukoamiasse, dan glukosa isomerase mendominasi fungsi reaksi konversi dari pati menjadi sirup fruktosa berkonsentrasi tinggi seperti: Dalam kehidupan sehari-hari, enzim protease ditambahkan dalam detergen sebagai penghilang noda. Noda dalam bentuk kerak protein dapat dengan mudah luruh dengan menambahkan enzim protease. Selain itu protease juga sering digunakan untuk melunakkan daging dan pembuatan keju.

Untuk enzim skala medis dan laboratorium, penggunaannya cenderung sedikit. Sedangkan enzim komersial membutuhkan kuantitas dalam jumlah ton. Selain itu perbedaan dari enzim tersebut juga dapat dilihat dari bentuk kemurniannya.

### 2.3. Kinetika Enzim Sederhana

Kinetika enzim berhubungan dengan kecepatan reaksi enzimatik dan bagaimana efek-efek yang ditimbulkannya termasuk efek kimia dan fisika. Dasar dari ilmu kinetika enzim adalah mekanisme dasar dari reaksi enzimatik dan parameter yang berhubungan dengan perubahan enzim tersebut. Persamaan reaksi yang dikembangkan dari kinetika dapat diaplikasikan untuk keperluan perhitungan waktu reaksi, yield yang dihasilkan, kondisi ekonomis yang optimum, yang sangat penting dalam desain bioreaktor.

Diasumsikan bahwa substrat (s) terkonversi menjadi produk (p) dengan bantuan enzim (e) di dalam reaktor dengan persamaan



Gambar 2.1. Perubahan konsentrasi produk dan substrat terhadap waktu



Jika kita mengamati konsentrasi substrat dan produk dengan rentang waktu tertentu, maka akan dihasilkan data konsentrasi produk akan meningkat dan mencapai nilai maksimum, sementara konsentrasi substrat akan menurun seperti pada Gambar 2.1.

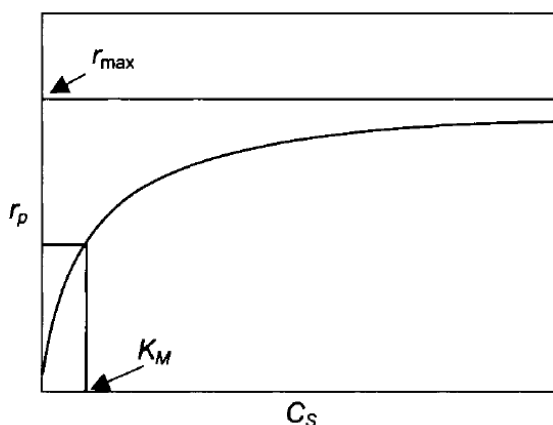
Kecepatan reaksi dapat dinyatakan dengan persamaan berdasarkan substratnya  $C_s$  atau berdasarkan konsentrasi produk  $C_p$

$$r_s = -\frac{dC_s}{dt} \dots\dots\dots(2.2.)$$

$$r_s = \frac{dC_p}{dt} \dots\dots\dots(2.3.)$$

$$\dots\dots\dots(2.12)$$

Untuk mengetahui keefektifan dan karakteristik reaksi enzimatik, perlu diketahui tentang kecepatan reaksi yang dipengaruhi oleh kondisi reaksi seperti substrat, produk, dan konsentrasi enzim. Jika kita mengamati kecepatan reaksi di awal dengan perubahan level substrat dan konsentrasi enzim, maka kita akan mendapatkan kurva yang digambarkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Efek konsentrasi substrat pada awal kecepatan reaksi (Dutta, 2008)

Dari kurva tersebut kita dapat menyimpulkan bahwa:

1. Kecepatan reaksi adalah proporsional terhadap konsentrasi substrat ketika konsentrasi substrat pada range rendah (biasa disebut reaksi orde satu).

## Dasar-dasar Bioproses

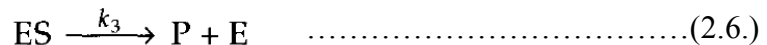
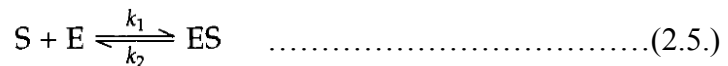
2. Kecepatan reaksi tidak bergantung pada konsentrasi substrat ketika konsentrasinya tinggi, karena perubahan kecepatan reaksi berubah dari orde satu menjadi orde nol seiring perubahan konsentrasi substrat yang semakin naik.
3. Kecepatan reaksi maksimum  $r_{max}$  adalah proporsional terhadap konsentrasi enzim.

Henri telah melakukan observasi terhadap kelakuan ini (Bailey & Ollis, 1986), dan mengajukan persamaan reaksi untuk enzim berupa:

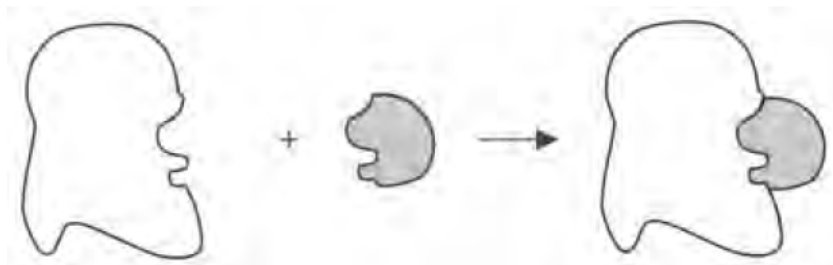
$$r = \frac{r_{max}C_s}{K_m + C_s} \dots\dots\dots(2.4.)$$

$r_{max}$  dan  $K_m$  adalah parameter kinetik yang dibutuhkan datanya dengan percobaan laboratorium. Karena persamaan tersebut hanya menggambarkan hasil eksperimen, maka masih diperlukan lagi pengembangan mekanisme reaksi yang mensupport persamaan ini.

Pada tahun 1902, Brown mengajukan hipotesis bahwa enzim merupakan senyawa yang kompleks. Senyawa kompleks ini kemudian menguraikan produk dan meregenerasi enzim bebas. Mekanisme dari satu reaksi enzim-substrat dapat dinyatakan dengan persamaan reaksi:



Salah satu teori original untuk memahami Kinetika Brown dengan mudah adalah teori kunci-gembok. Konsep utama dari hipotesis ini adalah terdapatnya topografi, yakni suatu lubang struktural antara enzim dan substrat (Gambar 2.3.).



Gambar 2.3. Teori Kunci Gembok untuk Senyawa Komplek Substrat-Enzim (Dutta, 2008)

Persamaan kecepatan reaksi dapat dibagi ke dalam beberapa mekanisme berdasarkan beberapa asumsi:

1. Konsentrasi total enzim adalah konstan selama reaksi.  $C_{E0}=C_{ES}+C_E$
2. Jumlah enzim adalah sangat kecil jika dibandingkan dengan jumlah substrat. Untuk itu keberadaan senyawa kompleks enzim-substrat tidak akan mengurangi konsentrasi substrat secara signifikan.
3. Konsentrasi produk adalah rendah sehingga faktor penghambat produk dapat diasumsikan tidak ada.

Sebagai tambahan dalam asumsi di atas, maka terdapat beberapa pendekatan dalam menyatakan persamaan reaksi enzimatis:

1. Pendekatan Michaelis-Menten (Michaelis & Menten, 1913). Pendekatan ini mengasumsikan bahwa reaksi reversibel lebih cepat dari reaksi pelepasan produk. Reaksi pelepasan tersebut menentukan kecepatan reaksi, sementara yang lain adalah seimbang. Asumsi ini terkadang diterapkan pada reaksi katalitik heterogen pada kinetika kimia. Meski enzim cenderung larut dalam air, molekul enzim memiliki struktur tiga dimensi yang kompleks dan besar. Oleh sebab itu, enzim dapat dianalogikan sebagai katalis solid dalam reaksi kimia.
2. Pendekatan Briggs-Haldane. (Briggs & Haldane, 1925). Pada pendekatan ini, diasumsikan bahwa tidak ada perubahan konsentrasi terhadap waktu, sehingga  $d(C_{ES})/dt=0$ . Hal ini juga disebut sebagai asumsi *pseudo-steady-state* dalam kinetika kimia dan terkadang digunakan dalam mengembangkan kecepatan reaksi katalis homogen.
3. Pendekatan Numerik. Pada pendekatan ini dilakukan pemodelan dalam reaksi enzimatis tanpa dilakukan penyederhanaan reaksi.

#### 2.2.1. Pendekatan Michaelis-Menten

Jika reaksi yang lebih lambat (Pers. 2.6.) menentukan kecepatan reaksi keseluruhan, maka kecepatan pembentukan produk dan konsumsi substrat adalah proporsional terhadap konsentrasi gabungan enzim-substrat.

$$r = \frac{dC_p}{dt} = \frac{dC_s}{dt} = k_3 C_{ES} \dots \dots \dots (2.7.)$$

Konsentrasi pada reaksi biasa dinyatakan dalam unit molar seperti kmol/m<sup>3</sup> atau mol/L. Konsentrasi dari gabungan enzim-substrat C<sub>ES</sub> pada Pers. 2.7. dapat dinyatakan sesuai konsentrasi substrat C<sub>s</sub> dan konsentrasi bebas enzim C<sub>E</sub> dari reaksi pertama yang dapat balik (Pers 2.5.) adalah dalam keadaan setimbang. Kemudian, reaksi berikutnya adalah sama dengan reaksi yang dapat balik, sehingga

$$k_1 C_s C_E = k_2 C_{ES} \dots \dots \dots (2.8.)$$

dengan mensubstitusikan persamaan 2.8. ke persamaan 2.7., persamaan reaksi dapat dinyatakan sebagai fungsi C<sub>s</sub> dan C<sub>E</sub>, dimana nilai C<sub>E</sub> tidak mudah ditentukan atau ditebak. Jika kita mengasumsikan bahwa enzim total semuanya telah terkonversi, maka konsentrasi enzim yang bebas, C<sub>E</sub>, dapat dinyatakan sebagai C<sub>E0</sub>

$$C_{E0} = C_E + C_{ES} \dots \dots \dots (2.9.)$$

Sekarang kita memiliki tiga persamaan untuk menghilangkan komponen C<sub>E</sub> dan C<sub>ES</sub> untuk menyatakan fungsi persamaan dalam bentuk konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim awal C<sub>E0</sub>. Dengan mensubstitusikan persamaan 2.8. ke 2.9., dan C<sub>E</sub> kita ganti dengan C<sub>E0</sub>, maka persamaan akan menjadi

$$C_{ES} = \frac{C_{E0} C_s}{\frac{k_2}{k_1} + C_s} \dots \dots \dots (2.10)$$

Substitusi persamaan 2.10 ke persamaan 2.7 menghasilkan persamaan akhir menjadi

$$r = \frac{dC_p}{dt} = -\frac{dC_s}{dt} = \frac{k_3 C_{E0} C_s}{\frac{k_2}{k_1} + C_s} = \frac{r_{max} C_s}{K_M + C_s} \dots \dots \dots (2.11)$$

persamaan tersebut disebut sebagai persamaan Michaelis Menten, identik dengan persamaan empiris untuk persamaan 2.4. K<sub>M</sub> pada persamaan 2.11 adalah konstanta Michaelis Menten. Dalam hal ini, pendekatan nilai K<sub>M</sub> adalah setara dengan konstanta disosiasi K<sub>1</sub> atau berbanding terbalik dengan konstanta kesetimbangan

$$K_M = \frac{k_2}{k_1} = K_1 = \frac{C_s C_E}{C_{ES}} = \frac{1}{K_{eq}} \dots \dots \dots (2.12)$$

Unit  $K_M$  adalah sama dengan  $C_S$ . Jika  $K_M$  adalah sama dengan  $C_S$ , maka  $r$  sebanding dengan setengah  $r_{\max}$  sesuai persamaan 2.11. Oleh sebab itu nilai  $K_M$  sebanding dengan konsentrasi substrat jika kecepatan reaksi bernilai setengah dari kecepatan reaksi  $r_{\max}$  (Gambar 2.2.).  $K_M$  adalah parameter kinetik karena memiliki karakteristik interaksi enzim dengan substrat yang diberikan.

Parameter kinetik lain Pers 2.11. adalah kecepatan reaksi maksimum  $r_{\max}$ , yang setara dengan konsentrasi awal enzim. Alasan utama untuk menggabungkan dua konstanta  $k_3$  dan  $C_{E0}$  dengan parameter  $r_{\max}$  adalah disebabkan kesulitan konsentrasi enzim dalam unit molar. Untuk menyatakan konsentrasi enzim dalam satuan molar, kita membutuhkan berat molekul dan jumlah enzim murni yang ditambahkan, di mana keduanya sangat sukar untuk ditentukan.

Konsentrasi enzim dapat dinyatakan sebagai unit massa selain unit molar, namun jumlah enzim tidak mudah dikuantifikasi dalam bentuk unit masa karena enzim tidak dalam keadaan kemurnian 100%. Oleh sebab itu, satuan enzim umumnya dinyatakan dengan satuan kecepatan katalis. Sebagai contoh, satu unit enzim *cellobiose* dapat dinyatakan dalam jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis cellobiosa untuk menghasilkan 1mmol glukosa permenit. Namun apapun unit yang digunakan untuk  $C_{E0}$ , unit  $k_3C_{E0}$  harus sama dengan  $r$ , yakni kmol/m<sup>3</sup>s. Selain itu diperlukan kekonsistenan unit jika konsentrasi enzim tidak dinyatakan dalam unit molar.

Persamaan Michaelis-Menten memiliki analogi dengan persamaan Langmuir isotherm

$$\theta = \frac{C_A}{K+C_A} \dots\dots\dots (2.13)$$

di mana  $\theta$  adalah fraksi dari permukaan solid yang ditutupi oleh molekul gas dan  $K$  adalah berbanding terbalik dengan konstanta equilibrium adsorpsi.

#### 2.2.2. Pendekatan Briggs-Haldan

Pendekatan ini juga mengacu pada dua persamaan dasar enzimatik dari Persamaan 2.5. dan Persamaan 2.6., dengan kecepatan pembentukan produk dan konsumsi substrat adalah

## Dasar-dasar Bioproses

$$\frac{dC_p}{dt} = k_3 C_{ES} \dots\dots\dots (2.14)$$

$$-\frac{dC_s}{dt} = k_1 C_s C_E - k_2 C_{ES} \dots\dots\dots (2.15)$$

diasumsikan bahwa perubahan  $C_{ES}$  terhadap waktu,  $dC_{ES}/dt$ , ditiadakan, sehingga

$$\frac{dC_s}{dt} = k_1 C_s C_E - k_2 C_{ES} - k_3 C_{ES} = 0 \dots\dots\dots (2.16)$$

substitusi persamaan 2.16 ke dalam persamaan 2.15 menghasilkan kecepatan pembentukan produk dan konsumsi substrat yang memiliki nilai yang sama,

$$r = \frac{dC_p}{dt} = -\frac{dC_s}{dt} = k_3 C_{ES} \dots\dots\dots (2.7)$$

Kemudian dengan pendekatan asumsi lain, kita nyatakan bahwa kandungan enzim total adalah

$$C_{E0} = C_E + C_{ES} \dots\dots\dots (2.9.)$$

substitusi Pers. 2.9. ke Pers. 2.16 dalam bentuk  $C_{ES}$

$$C_{ES} = \frac{C_{E0} C_s}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + C_s} \dots\dots\dots (2.17)$$

Untuk menyederhanakan persamaan dalam bentuk kecepatan konsumsi substrat atau produk, maka Persamaan 2.17 dimasukkan ke dalam Persamaan 2.14 menghasilkan persamaan akhir

$$r = \frac{dC_p}{dt} = -\frac{dC_s}{dt} = \frac{k_3 C_{E0} C_s}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + C_s} = \frac{r_{max} C_s}{K_M + C_s} \dots\dots\dots (2.18)$$

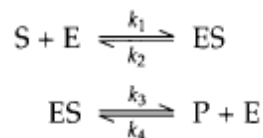
Persamaan tersebut memiliki kesamaan dengan Persamaan Michaelis-Menten. (Pers. 2.11), namun nilai  $K_M$  dalam persamaan ini memiliki arti yang berbeda. Pada pendekatan Michaelis Menten, nilai  $K_M$  adalah setara dengan konstanta disosiasi  $k_2/k_1$ , sementara pada pendekatan Briggs-Haldane, nilai  $K_M$  setara dengan nilai  $(k_2+k_3)/k_1$ . Persamaan 2.18 dapat disederhanakan menjadi persamaan 2.11. jika nilai  $k_2 \gg k_3$ . Hal

ini berarti nilai disosiasi senyawa gabungan enzim-substrat sangat besar dari nilai pelepasan produk.

Dalam kenyataannya, hal ini memang sering terjadi di banyak reaksi enzimatik. Karena pembentukan senyawa kompleks tersebut memiliki interaksi yang lemah, dimungkinkan bahwa kecepatan disosiasinya terjadi dengan sangat cepat.

**Contoh 2.1.**

Ketika glukosa dikonversi menjadi fruktosa oleh enzim glukosa isomerase, langkah-langkah pembentukannya dinyatakan:



Carilah persamaan kecepatan reaksi dengan menggunakan pendekatan (a) Michaelis-Menten, dan (b) Briggs-Haldane. Jelaskan pada kondisi seperti apakah persamaan kecepatan Briggs-Haldane dapat disederhanakan menjadi Michaelis-Menten.

Jawab

(a) Pendekatan Michaelis-Menten.

Kecepatan pembentukan produk adalah:

$$r_p = k_3 C_{ES} - k_4 C_p C_E \dots \dots \dots (2.19)$$

karena enzim pada kondisi awal, maka

$$C_{E0} = C_E + C_{ES} \dots \dots \dots (2.20)$$

substitusi persamaan 2.20 ke persamaan 2.19. dalam bentuk  $C_E$ , menghasilkan

$$R_p = (k_3 + k_4 C_p) C_{ES} - k_4 C_p C_{E0} \dots \dots \dots (2.21)$$

Diasumsikan bahwa reaksi pertama yang reversibel adalah dalam keadaan setimbang, sehingga persamaan menjadi

$$C_{ES} = \frac{k_1}{k_2} C_E C_S \dots \dots \dots (2.22)$$

Substitusi persamaan 2.22 ke persamaan 2.20, untuk  $C_E$  dan  $C_{ES}$  menghasilkan persamaan



$$C_{ES} = \frac{C_{E0}C_S}{\frac{k_2}{k_1} + C_S} \dots\dots\dots (2.23)$$

Substitusi persamaan 2.23 ke persamaan 2.8. menjadi

$$r_p = \frac{k_3 C_{E0} (C_S - \frac{k_4 k_2}{k_3 k_1} C_p)}{\frac{k_3}{k_1} + C_S} \dots\dots\dots (2.24.)$$

(b) Pendekatan Briggs-Haldane.

Diasumsikan bahwa perubahan konsentrasi senyawa kompleks terhadap waktu,  $dC_{ES}/dt$ , adalah nol. Maka

$$\frac{dC_{ES}}{dt} = k_1 C_S C_E - k_2 C_{ES} - k_4 C_p C_E = 0 \dots\dots\dots (2.25)$$

substitusi persamaan 2.20 ke persamaan 2.25 untuk  $C_E$ , sehingga menjadi

$$C_{ES} = \frac{C_{E0}(k_1 C_S + k_4 C_p)}{(k_2 + k_3) + k_1 C_S + k_4 C_p} \dots\dots\dots (2.26)$$

dengan memasukkan persamaan 2.26 ke persamaan 2.19 untuk  $C_{ES}$ , menghasilkan

$$r_p = \frac{k_3 C_{E0} (C_S - \frac{k_4 k_2}{k_3 k_1} C_p)}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + C_S + \frac{k_4}{k_1} C_p} \dots\dots\dots (2.27)$$

Jika langkah reaksi pertama, , memiliki kecepatan reaksi lebih cepat dari langkah ke dua, maka  $k_2$  dan  $k_3$  lebih besar dari  $k_4$ . Sehingga pada persamaan 2.27 dapat dinyatakan

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} \cong \frac{k_2}{k_1} \dots\dots\dots (2.28)$$

dan  $\frac{k_4}{k_1} \cong 0 \dots\dots\dots (2.29)$

sehingga persamaan 2.27 dapat disederhanakan menjadi persamaan 2.24.

## **2.4. Evaluasi Parameter Kinetik**

Untuk mengetahui nilai estimasi dari parameter kinetik, kita membutuhkan eksperimen kecil dengan setting batch yang disusun seri dengan beberapa perbedaan konsentrasi substrat. Kemudian kecepatan awal reaksi dapat dihitung sebagai fungsi awal konsentrasi substrat. Dari eksperimen tersebut akan diperoleh data dan diolah dalam bentuk grafik sehingga model kinetik yang telah kita buat dapat diketahui validitasnya

dengan menggunakan grafik tersebut dan beberapa nilai parameter kinetk dapat kita estimasi.

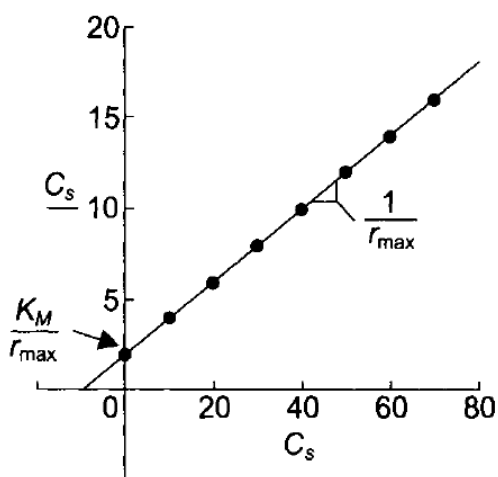
Diagram yang umum digunakan untuk memplotkan antara  $r$  dan  $C_s$  dapat dilihat pada Grafik 2.2. Asimtot untuk  $r$  adalah  $r_{\max}$ , dan  $K_M$  setara dengan  $C_s$  saat  $r=0.5r_{\max}$ . Namun penggunaan grafik ini kurang efektif untuk mengetahui nilai  $r_{\max}$  dan  $K_M$  karena ketidakakuratan asimtot dan sulit mengetes validitas model kinetiknya. Untuk itu persamaan Michaelis Menten biasanya dimodel ulang sehingga grafik dapat dinyatakan dalam bentuk linier. Ada tiga cara linierisasi Michaelis Menten, yakni:

$$\frac{C_s}{r} = \frac{K_M}{r_{\max}} \frac{C_s}{r_{\max}} \dots\dots\dots (2.30)$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{K_M}{r_{\max}} \frac{1}{C_s} \dots\dots\dots (2.31)$$

$$r = r_{\max} - K_M \frac{r}{C_s} \dots\dots\dots (2.32)$$

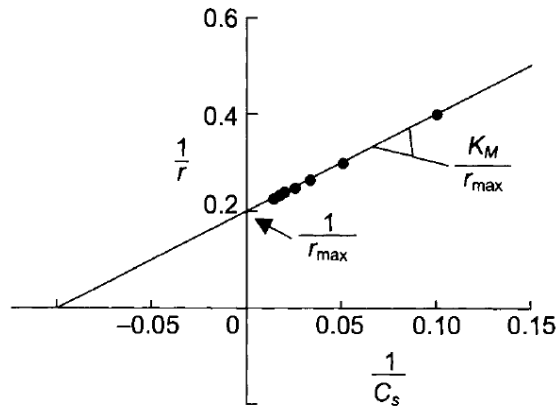
Persamaan 2.30 biasa disebut Persamaan Langmuir (Carberry, 1976) untuk mengolah data adsorpsi gas ke permukaan padatan. Jika persamaan Michaelis Menten diaplikasikan untuk ini, maka plot Langmuir akan menghasilkan garis lurus, dan slope dapat dinyatakan dalam  $1/r_{\max}$ . Sedangkan intersep adalah  $K_M/r_{\max}$ , seperti pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Plot Langmuir ( $K_M=10$ ,  $r_{\max}= 5$ ) (Dutta, 2008)

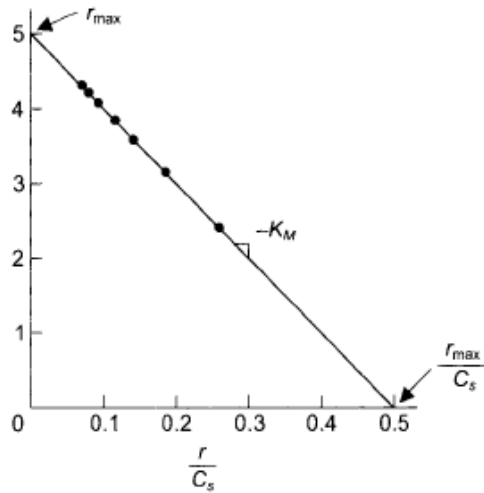
Hal yang sama juga diperoleh pada persamaan 2.31, di mana plot antara  $1/r$  terhadap  $1/C_s$  akan menghasilkan garis lurus. Slope yang dihasilkan adalah  $K_M/r_{\max}$ ,

sedangkan intersep  $1/r_{\max}$ . Grafik ini disebut plot Lineweaver-Burk (Lineweaver and Burk, 1934) seperti terlihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Plot Lineweaver-Burk ( $K_M=10$ ,  $r_{\max}=5$ ) (Dutta, 2008)

Untuk plot antara  $r$  terhadap  $r/C_s$  akan menghasilkan garis lurus di mana slope yang dihasilkan adalah nilai  $-K_M$  dan intersep  $r_{\max}$  (Gambar 2.6). Plot ini dinamakan plot Eadie-Hofstee (Eadie, 1942; Hofstee, 1952).



Gambar 2.6. Plot Eadie-Hofstee ( $K_M=10$ ,  $r_{\max}=5$ ) (Dutta, 2008)

Plot Lineweaver Burk lebih banyak digunakan karena menunjukkan hubungan antara variabel independen  $C_s$  dan variabel dependen  $r$ . Namun kekurangan dari plot ini adalah ketidakakuratan pengamatan pada konsentrasi substrat yang berlevel rendah dan pada titik yang tinggi terlalu membutuhkan banyak substrat. Di lain hal, plot Eadie-Hofstee sedikit lebih baik dalam pengumpulan data karena kebutuhan titik yang lebih sedikit. Kelemahan dari plot ini adalah kecepatan reaksi yang muncul pada kedua

koordinat yang umumnya berupa variabel dependen. Sedangkan plot Langmuir ( $C_s/r$  terhadap  $C_s$ ) merupakan plot yang paling baik di antara plot lainnya karena data yang dibutuhkan tidak terlalu banyak namun juga sesuai dengan kaidah persamaan enzimatik.

Nilai parameter kinetik dapat diestimasi dengan menggambarkan garis least square setelah memplotkan data pada format yang sesuai. Garis regresi linear juga dapat digambarkan lebih akurat dengan menggunakan fungsi statistik seperti pemrograman Excel dan sebagainya.

Dari uraian di atas, dapat kita tarik kesimpulan bahwa nilai persamaan Michaelis Menten dengan parameter  $r_{\max}$  dan  $K_M$ , dapat dicari dengan:

1. Membuat eksperimen secara seri dan batch dengan beberapa level konsentrasi substrat yang berbeda dengan penambahan konsentrasi enzim yang seragam dan konstan, kemudian kita teliti perubahan produk atau perubahan konsumsi substrat terhadap perubahan waktu
2. Mengestimasi kecepatan awal reaksi dari  $C_s$  atau  $C_p$  terhadap waktu untuk perbedaan konsentrasi substrat
3. Mengestimasi parameter kinetik dengan memplotkan grafik.

#### Contoh 2.2.

Dari suatu eksperimen batch dengan menggunakan konsentrasi enzim yang konstan, diperoleh data kecepatan awal terhadap perubahan konsentrasi substrat

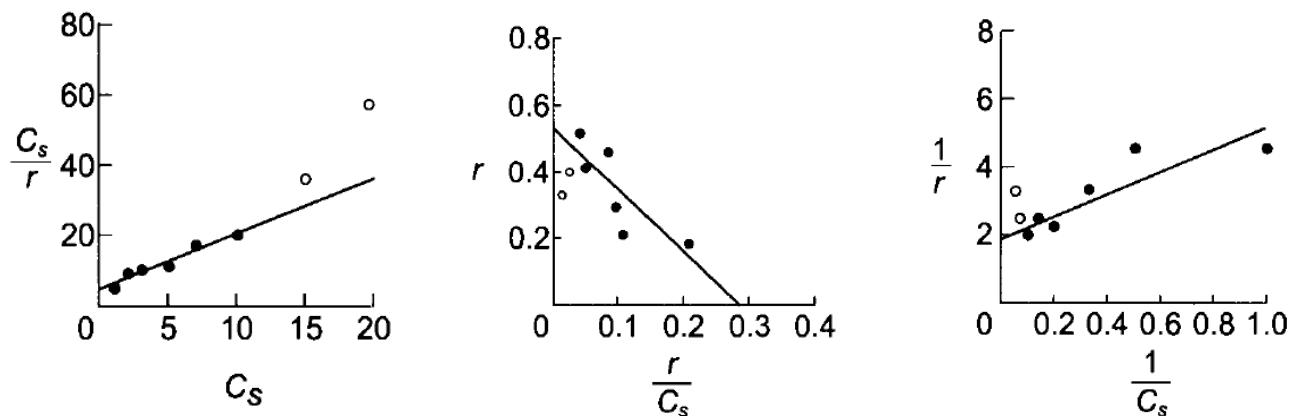
Konsentrasi substrat (mmol/L)	Kecepatan reaksi awal mmol/L menit
1	0.2
2	0.22
3	0.3
5	0.45
7	0.41
10	0.50
15	0.40
20	0.33

## Dasar-dasar Bioproses

- Evaluasi parameter kinetika Michaelis Menten dengan menggunakan plot Langmuir, Eadie-Hofstee, dan Lineweaver-Bur, dan teknik regresi nonlinearnya. Dalam evaluasi parameter kinetik, jangan memasukkan data yang menyimpang (deviasi) dari model. Jelaskan kenapa terjadi deviasi dalam eksperimen.
- Bandingkan prediksi dari tiap model dengan memplotkan  $r$  vs  $C_s$  dengan poin data, dan jelaskan kelebihan dan kelemahan dari metode itu
- Ulangi point a dengan menggunakan semua data yang ada termasuk data deviasi.

Jawab

- Dari data yang ada, didapatkan suatu hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat sampai 10mM, kecepatan reaksi juga semakin meningkat. Namun pada level 15 mM, kecepatan menjadi turun. Fenomena ini kemungkinan berasal dari gangguan substrat atau produk. Karena persamaan Michaelis Menten tidak menyatakan efek gangguan, maka kita tidak menyertakan dua data terakhir dan membatasi pengembangan model dengan menggunakan konsentrasi substrat rendah ( $C_s < 10\text{mM}$ ). Gambar 2.7. memperlihatkan tiga plot yang dtelah dibuat dari data eksperimen. Dua data terakhir yang tidak disertakan pada grafik dapat dilihat pada titik putih.



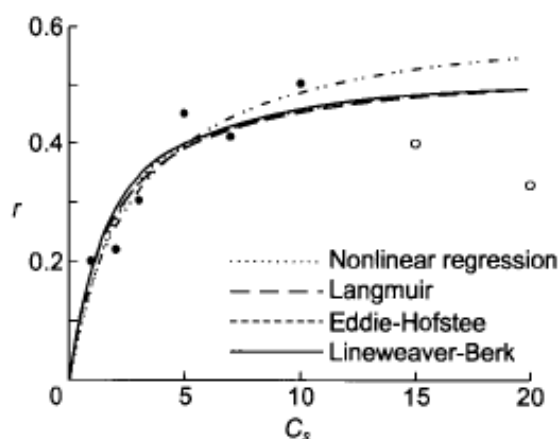
Gambar 2.7. Plot berdasarkan data contoh 2.2.

dengan menggunakan pemodelan seperti matlab atau scipad, kita dapat mengestimasi parameter. Dalam hal ini digunakan program SAS NLIN (Tabel 2.1.) dengan menggunakan metode iterasi Gauss-Newton sampai didapatkan hasil yang konvergen.

Tabel 2.1. Pemodelan komputer SAS NLINE (Dutta, 2008)

Computer Input:				
DATA Example3;				
INPUT CS R @@;				
CARDS;				
1 0.20 2 0.22 3 0.30 5 0.45 7 0.41 10 0.50;				
PROC NLIN METHOD=GAUSS; /* Gaussian method is default. */				
PARAMETERS RMAX=0.5 KM=1; /* Starting estimates of parameters.*/				
MODEL R=RMAX*CS/(KM+CS); /* dependent=expression */				
DER.RMAX=CS/(KM+CS); /* Partial derivatives of the model */				
DER.KM=-RMAX*CS/((KM+CS)*(KM+CS));/* with respect to each parameter. */				
Computer Output:				
PARAMETER	ESTIMATE	ASYMPTOTIC STD. ERROR	95 % CONFIDENCE INTERVAL LOWER	UPPER
RMAX	0.6344375	0.08593107	0.395857892	0.87301726
KM	2.9529776	1.05041396	0.036600429	5.86935493

- b. Gambar 2.8. memperlihatkan kecepatan reaksi terhadap konsentrasi substrat yang diprediksi menggunakan persamaan Michaelis Menten dengan nilai parameter yang diperoleh dari empat metode.



Gambar 2.8. Kurva Kecepatan reaksi ( $r$ ) terhadap  $C_s$  yang diprediksi dengan persamaan Michaelis Menten menggunakan nilai parameter yang didapatkan dengan empat metode (Dutta, 2008)

Keempat metode tersebut memprediksi kecepatan reaksi dengan baik dengan range konsentrasi  $C_s < 10 \text{ mmol/L}$  dari nilai parameter yang telah diestimasi.

Kecepatan reaksi yang diprediksi dari plot Lineweaver-Burk menampilkan hasil yang paling akurat dibanding metode plot lain jika dalam kondisi konsentrasi substrat yang paling rendah dan deviasi konsentrasi naik. Pada plot Eadie-Hofstee diperoleh hasil yang hampir sama dengan Lineweaver-Burk namun dengan derajat yang lebih kecil. Sedangkan pada plot Langmuir dan regresi nonlinear memiliki kesamaan yang hampir identik karena data yang digunakan hampir sama.

- c. Penurunan kecepatan yang terjadi pada konsentrasi substrat lebih dari  $10 \text{ mmol/L}$  dapat diinterpretasikan dengan menggunakan metode yang sebelumnya namun memiliki hasil yang berbeda. Tabel 2.2. adalah berasal dari nilai estimasi yang diperoleh dari keseluruhan data yang memiliki hasil signifikan.

Pada hasil tersebut, nilai parameter dari plot Lineweaver-Burk dan plot Eadie-Hofstee tidak memiliki perbedaan yang signifikan jika dibanding plot langmuir. Hal ini disebabkan data deviasi pada konsentrasi tinggi ditiadakan dan nilai konsentrasi substrat pada level rendah memiliki kelabilan.

Tabel 2.2. Hasil estimasi parameter beberapa metode (Dutta, 2008)

Metode	Untuk $C_s < 10 \text{ mmol/L}$		Untuk semua Data	
	$r_{\max}$	$K_M$	$r_{\max}$	$K_M$
<b>Langmuir</b>	0.63	2.92	0.37	-0.04
<b>Lineweaver-Burk</b>	0.54	1.78	0.45	1.37
<b>Eadie-Hofstee</b>	0.54	1.89	0.45	1.21
<b>Regresi Nonlinear</b>	0.63	2.95	0.46	1.30

Pada nilai  $K_M$  plot Langmuir, hasil yang diperoleh bernilai negatif. Hal ini berarti model Michaelis Menten tidak dapat diterapkan. Sedangkan dengan menggunakan regresi nonlinear dapat memberikan nilai parameter yang lebih baik dibanding yang lain, jika menggunakan keseluruhan data.

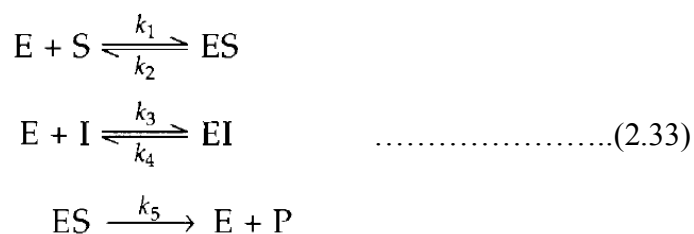


## 2.5. Penghambat pada Reaksi Enzimatis

Dalam istilah bioproses, terutama untuk reaksi enzimatis, dikenal beberapa istilah seperti modulator dan inhibitor (Dutta, 2008). Modulator adalah suatu zat atau senyawa yang dapat bergabung dengan enzim untuk mengubah aktifitas katalis. Sedangkan inhibitor atau menghambat adalah modulator yang dapat menurunkan aktivitas enzimatis. Inhibitor dapat menurunkan kecepatan reaksi secara kompetitif, nonkompetitif, atau parsial.

### 2.4.1. Penghambatan Kompetitif

Inhibitor kompetitif memiliki struktur yang kuat terhadap substrat, di mana inhibitor maupun substrat berkompetisi untuk mengisi situs aktif pada enzim. Pembentukan senyawa kompleks enzim-inhibitor dapat mengurangi jumlah enzim yang ada saat terjadi interaksi dengan substrat dan berdampak pada penurunan kecepatan reaksi. Inhibitor kompetitif secara normal bergabung dengan enzim lewat reaksi reversibel. Maka dari itu, inhibitor ini dapat diminimalisasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat, meski terkadang substrat juga dapat berperan sebagai inhibitor saat terjadi reaksi. Mekanisme penghambatan kompetitif adalah sebagai berikut



Jika reaksi lebih lambat, langkah pembentukan produk, menentukan kecepatan reaksi berdasarkan asumsi Michaelis Menten, maka kecepatan reaksi dapat dinyatakan:

$$r_p = k_5 C_{ES} \quad \dots\dots\dots (2.34)$$

neraca enzimatis yang diperoleh

$$C_{E0} = C_E + C_{ES} + C_{EI} \quad \dots\dots\dots (2.35)$$

Dari dua reaksi setimbang,

$$\frac{C_E C_S}{C_{ES}} = \frac{k_2}{k_1} = K_S \dots\dots\dots (2.36)$$

$$\frac{C_E C_S}{C_{EI}} = \frac{k_4}{k_3} = K_I \dots\dots\dots (2.37)$$

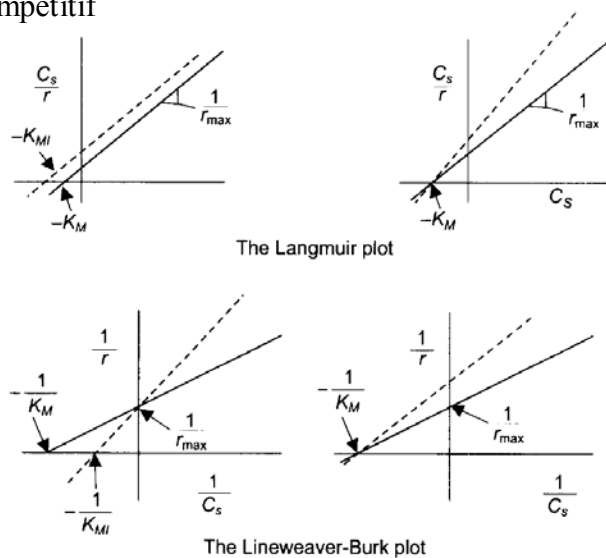
$K_S$  dan  $K_I$  adalah konstanta disosiasi yang sesuai dengan konstanta kesetimbangan. Dengan mengkombinasi empat persamaan tersebut dapat dilakukan eliminasi  $C_E$ ,  $C_{ES}$ , dan  $C_{EI}$  sehingga

$$r_p = \frac{r_{max} C_S}{C_S + K_{MI}} \dots\dots\dots (2.38)$$

di mana nilai

$$K_{MI} = K_S \left( 1 + \frac{C_I}{K_I} \right) \dots\dots\dots (3.39)$$

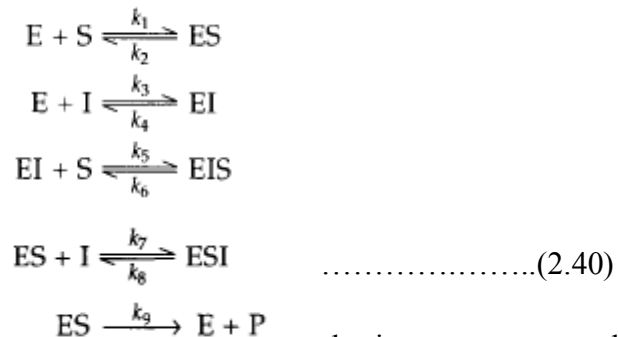
oleh sebab itu, karena  $K_{MI}$  lebih besar dari  $K_S$ , maka kecepatan reaksi akan berkurang karena adanya penghambat sesuai persamaan 2.39. Hal yang menarik adalah kecepatan reaksi maksimum tidak dipengaruhi oleh adanya penghambat kompetitif. Namun jumlah substrat yang sangat banyak diperlukan untuk mencapai kecepatan maksimum. Gambar 2.9. menyatakan fenomena penghambat kompetitif



Gambar 2.9. Efek Penghambat (a) kompetitif (b) non kompetitif (Dutta, 2008)

#### 2.4.2. Penghambat non kompetitif

Penghambat non kompetitif berinteraksi dengan enzim dengan berbagai cara. Penghambat tersebut dapat bereaksi secara reversibel maupun non reversibel pada situs aktif maupun pada region lain. Mekanisme penghambat non kompetitif dapat dinyatakan sebagai berikut:



Karena susbstrat dan inhibitor tidak saling berkompetisi pada situs yang sama pada pembentukan senyawa kompleks enzim-substrat atau enzim inhibitor, maka kita dapat mengasumsikan bahwa konstanta disosiasi untuk reaksi pertama yang setimbang adalah sama seperti reaksi ketiga yang setimbang, sehingga:

$$\frac{k_2}{k_1} = K_S = \frac{k_6}{k_5} = K_{IS} \dots\dots\dots (2.41)$$

atau, 
$$\frac{k_4}{k_3} = K_I = \frac{k_8}{k_7} = K_{SI} \dots\dots\dots (2.42)$$

Seperti diterangkan pada sesi sebelumnya, kecepatan reaksi dapat dihitung menggunakan pendekatan Michaelis Menten, sehingga

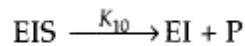
$$rp = \frac{r_{I,max}C_S}{C_S + K_S} \dots\dots\dots (2.43)$$

dimana

$$r_{I,max} = \frac{r_{max}}{1 + \frac{CI}{KI}}$$

Maka kecepatan reaksi maksimum akan berkurang dengan adanya penghambat non kompetitif, sementara konstanta Michaelis  $K_S$  tidak akan dipengaruhi oleh penghambat. Fenonema ini dapat kita lihat pada Gamabr 2.12.

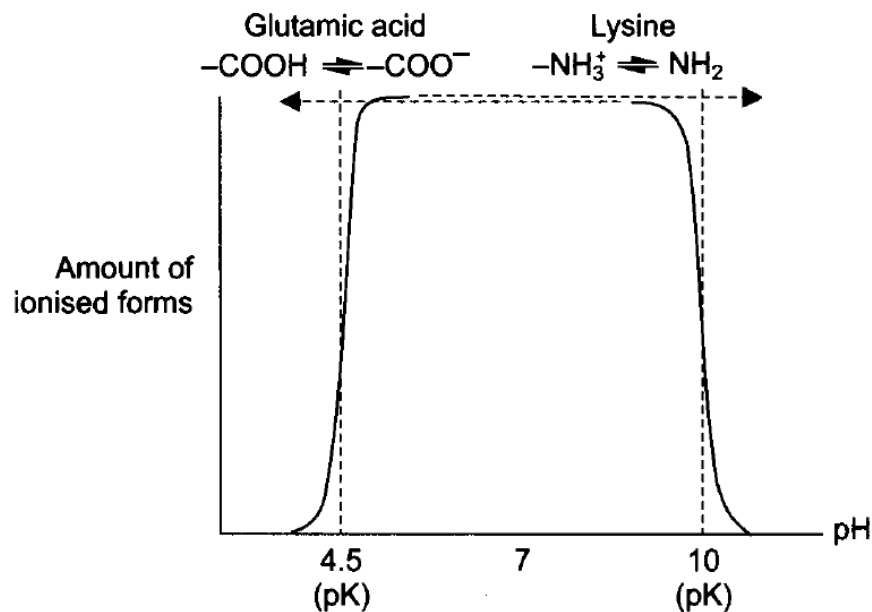
Beberapa variasi mekanisme untuk hambatan non kompetitif adalah mungkin. Salah satu kasus adalah saat senyawa enzim- inhibitor-substrat dapat terdekomposisi untuk menghasilkan produk dan senyawa kompleks enzim-inhibitor. Mekanisme ini dapat dijabarkan dengan menambahkan reaksi lambat pada persamaan reaksi 2.40



Kasus ini disebut sebagai hambatan kompetitif parsial.

## 2.6. Pengaruh Lain pada Aktivitas Enzim

Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi oleh beberapa kondisi kimia dan fisika. Beberapa faktor penting yang umum dijumpai adalah konsentrasi beberapa komponen (substrat, produk, enzim, kofaktor, dan sebagainya), pH, temperatur, dan gesekan partikel. Beberapa efek tentang konsentrasi telah kita bahas sebelumnya. Pada bagian ini akan dibahas mengenai efek pH, temperatur, dan gesekan.



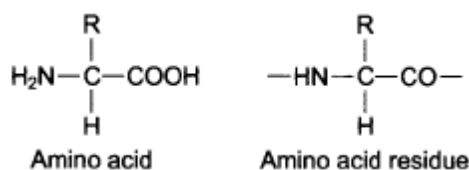
Gambar 2.10. Kontrol pH optimum oleh grup terion dari residu asam amino  
(Wiseman dan Gould, 1970)

### 2.6.1. Efek pH

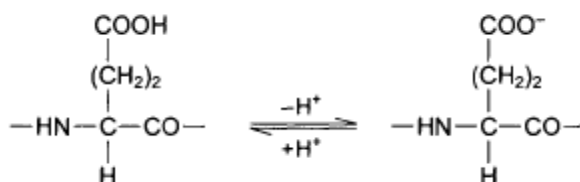
kecepatan reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh pH baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Hubungan kecepatan reaksi dan pH dapat dilihat pada Gambar 2.10. pH optimum untuk enzim memiliki perbedaan tersendiri. Sebagai contoh, pepsin dari perut sangat cocok pada pH optimum antara 2 dan 3,3. Sementara pH untuk amilase, dari saliva, adalah 6,8. Berbeda lagi dengan enzim chymotrypsin, pH yang dibutuhkan pada kondisi basa yakni 7-8.

Alasan bahwa reaksi enzimatik dipengaruhi oleh pH dapat dijelaskan sebagai berikut:

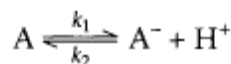
1. Enzim merupakan protein yang terdiri dari residu asam amino (yakni asam amino tanpa air).



2. Residu asam amino dapat berupa basa, asam, atau netral. Sebagai contoh, terdapat satu asam amino, asam glutamat, yang bersifat asam pada pH rendah, Seiring naiknya pH, asam glutamat terionisasi



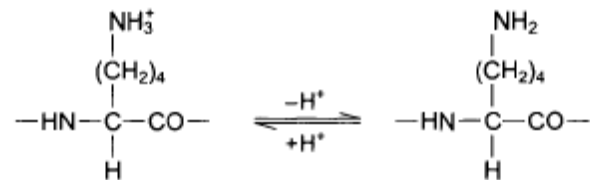
atau dalam persamaan reaksi menjadi



dalam kesetimbangan,  $\frac{C_{A^-}}{C_A} = \frac{k_1}{k_2} = K$

saat  $C_{A^-} = C_A$ , nilai pH adalah setara dengan pK. Untuk asam glutamat, pK=4.5.

Di lain hal, asam amino, lysine, adalah basa pada range pH tinggi. Seiring penurunan pH, lysin terionisasi menjadi:



3. Enzim merupakan senyawa katalis aktif jika residu asam amino berada pada situs aktif. Untuk itu, fraksi dari enzim aktif ini sangat bergantung pada pH. Sebagai ilustrasi, saat dua asam amino, (asam glutamat dan lysin), memenuhi situs aktif pada molekul enzim. Karena asam glutamat sensitif pada  $\text{pH} > 4,5$  dan lysine sensitif pada  $\text{pH} < 10$ , maka enzim akan sangat aktif pada  $\text{pH} 4,5 < \text{pH} < 10$ , seperti pada Gambar 2.10.

#### 2.6.2. Efek Temperatur

Kecepatan reaksi kimia dipengaruhi oleh temperatur sesuai persamaan Arrhenius

$$k = A_0 e^{-E/RT}$$

Sehingga saat  $\ln k$  diplotkan terhadap  $1/T$ , diperoleh garis lurus dengan nilai slope  $-E/R$

Ketergantungan temperatur dari reaksi enzimatik dapat dijelaskan dengan persamaan Arrhenius. Sesuai persamaan, seiring naiknya temperatur pada saat terjadinya reaksi, maka kecepatan reaksi juga meningkat. Hal ini karena atom pada molekul enzim memiliki energi lebih besar untuk bergerak dan bertumbukan.

Namun demikian, temperatur merupakan faktor sensitif pada senyawa biologis. Seiring naiknya suhu, proses denaturasi akan menghancurkan molekul enzim. Hal ini disebabkan rantai protein pada enzim mudah putus pada suhu tinggi (seperti hidrogen) sehingga akan menurunkan kecepatan reaksi. Untuk banyak jenis protein, denaturasi terjadi pada suhu 45 hingga 50. Beberapa enzim sangat sensitif pada temperatur tinggi, khususnya enzim yang diisolasi dari organisme termofil yang umumnya hidup pada suhu panas.

### 2.6.3. Efek Gesekan

Enzim diyakini sangat berpengaruh terhadap tekanan mekanik, yang dapat merusak bentuk molekul enzim seperti halnya denaturasi. Gesekan mekanik yang mungkin terjadi adalah karena gesekan sel pada vesel, pada pipa, atau pada saat pengadukan. Efek gesekan terhadap stabilitas enzim sangat penting untuk desain bioreaktor karena isi bioreaktor membutuhkan komponen seperti pengaduk, baffle dan beberapa komponen lain untuk meminimalkan kerusakan akibat transfer masa.

Charm dan Wong (1970) menyatakan bahwa katalis enzim, rennet, dan carboxypeptida, secara parsial mematikan aktifitas enzim. Mereka melakukan eksperimen pada siliner coaxial. Aktifitas enzim dinyatakan dengan persamaan:

$$\gamma = \frac{du}{dy} = \frac{\tau}{\mu}$$

di mana gamma adalah kecepatan gesekan, teta adalah waktu gesekan, tau adalah shear stres ( $\text{N/m}^2$ ) dan miu adalah kecepatan fluida. Pada kasus ini, sekitar 50% aktifitas enzim menurun seiring niaknya gesekan dan waktu terjadinya gesekan pada level  $5 \times 10^7$ .

Namun beberapa peneliti lain juga membantah adanya pengaruh gesekan terhadap enzim. Thomas dan Dimnill (1979) mempelajari efek gesekan terhadap katalase dan urease dengan menggunakan bioraktor coaxial yang diisolasi untuk menghindari kontak dengan udara. Mereka menemukan bahwa tidak ada perubahan aktifitas enzim yang diakibatkan tekanan gesekan dengan nilai kecepatan gesekan hingga  $10^6$  / detik. Mereka juga menyatakan bahwa hasil eksperimen yang diperoleh pada eksperimen Charm dan Wong (1970) adalah karena kombinasi antara gesekan, interaksi cairan-udara, dan beberapa efek yang tidak diketahui. Hal ini juga telah diteliti oleh Jones dan Lee (1988), yang menyatakan bahwa efek gesekan saja tidak akan mempengaruhi aktifitas enzim namun juga dipengaruhi efek lain.

## **BAB III**

---

### **IMOBILISASI ENZIM**

Imobilisasi sel didefinisikan sebagai sel yang dipertahankan pergerakannya baik secara natural atau disengaja dalam fase cair dan dalam sistem tertentu di dalam suatu matriks sehingga sebagian besar pergerakannya berkurang namun masih dapat melakukan aktifitas katalitiknya serta dapat digunakan berulang ulang. Teknik imobilisasi ini dapat dilakukan pada enzim maupun sel mikroba. Berbeda dengan metode *entrapment* (penjeratan), metode imobilisasi tidak hanya terjerat pada matriks pembungkus, namun sel dapat terabsorb ke dalam material support (matriks) nya.

Hampir sebagian besar enzim tersusun dari protein globular dan mudah larut dalam air. Dalam industri komersial, hal ini menjadi kendala karena enzim sukar dipisahkan dari produk dan pada kondisi batch, enzim tidak bisa digunakan kembali padahal harga enzim tergolong mahal.

Metode yang paling tepat yang dapat diaplikasikan untuk menyelesaikan masalah ini adalah imobilisasi enzim. Imobilisasi di sini berarti memasukkan suatu sel ke dalam senyawa matrix atau menutupi suatu sel dengan matrix sehingga diperoleh ukuran sel yang lebih besar dengan metode fisika atau kimia.

Kelebihan metode imobilisasi enzim adalah:

- a. Imobilisasi sel dapat memberikan stabilitas enzim yang lebih baik
- b. Imobilisasi enzim dapat digunakan pada sistem aliran kontinyu
- c. Pemisahan enzim dari produk menjadi lebih mudah

Selain memiliki kelebihan, imobilisasi sel juga memiliki kelemahan di antaranya:

- a. Ongkos untuk bahan matrik menjadi tinggi bila diaplikasikan dalam skala komersial
- b. Transfer massa yang kurang baik
- c. Kehilangan aktifitas selama imobilisasi
- d. Perubahan karakteristik enzim



### 3.1. Teknik Imobilisasi

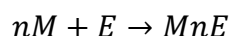
Teknik imobilisasi umumnya diklasifikasikan ke dalam dua metode, yakni metode kimia dan fisika. Perbedaan keduanya adalah ikatan kovalen dan non kovalen yang terbentuk.

#### 3.1.1. Metode Kimia

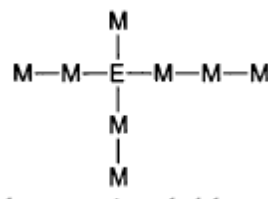
##### a. Pemasangan Kovalen

Metode ini sangat umum digunakan pada imobilisasi enzim. Pemasangan kovalen untuk molekul enzim menggunakan residu asam amino non esensial ke dalam senyawa yang tidak larut ke dalam air. Beberapa grup fungsional residu asam amino yang biasa digunakan adalah phenyl, hydroxyl, atau grup imidazola.

Variasi lain dari imobilisasi menggunakan pemasangan kovalen adalah kopolimersisasi enzim menggunakan monomer reaktif (M) seperti



di mana MnE memiliki struktur



Umumnya support untuk pemasangan kovalen yang tidak larut dalam air ini berasal dari bahan sintesis seperti polimer acrylamida, polimer styrene basa, dan polypeptida. Sedangkan dari bahan alami berasal dari agarosa, selulosa, dextran, gelas, dan pati (Zaborsky, 1973).

Senyawa polimer yang aktif seperti kopolimer maleat anhidrat akan mudah dimix dengan enzim untuk menghasilkan enzim terimobilisasi. Biasanya polimer sintesis atau alami membutuhkan aktivasi terlebih dahulu dengan menggunakan reagent sebelum ditambahkan ke senyawa enzim. Aktivasi ini melibatkan konversi kimia grup fungsional dari polimer. Hal yang menjadi perhatian adalah

selama proses imobilisasi, situs aktif enzim tidak boleh tersentuh dengan bagian matrix, atau aktivitas enzim akan menurun selama imobilisasi.

Berikut adalah ilustrasi tentang imobilisasi enzim glukosa oksida dalam matrix agarosa (Gutcho, 1974).

1. Aktivasi agarosa

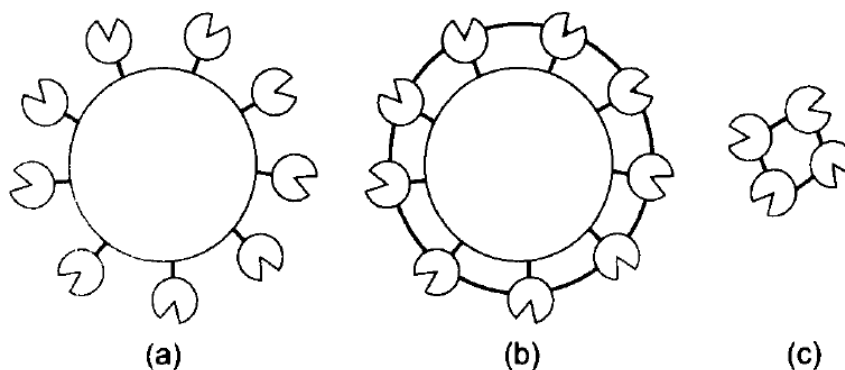
eliminasi air yang excess untuk menghindari terjadinya penyerapan air berlebih dari agarosa dengan melewatkannya ke filter kaca. Tambahkan 3.9 gram serbuk yang terdiri dari 100mg shrunken dan agarosa kering ke dalam 4ml cairan cyanogen bromida. Diamkan serbuk teraktivasi selama 6 menit pada pH 11 dengan menambahkan 2 M natrium hidroksida. Cuci produk yang telah teraktivasi dengan 1 L air dingin. Selanjutnya dilakukan pencucian kembali dengan cepat menggunakan 0.1 M buffer fosfat (pH 7.4).

2. Pencampuran enzim

Reaksikan agarosa yang telah aktif tadi dengan 24 mg enzim yang telah dilarutkan ke dalam 1 ml fosfat 0.1 M pada pH 7.4. Aduk larutan selama 10 jam. Hasil akhir dari proses ini berupa bola-bola kecil yang didalamnya adalah enzim sedangkan bagian luar berupa agarosa aktif.

b. Cross-linking menggunakan reagen multifungsi

Enzim yang tidak larut dalam air dapat disiapkan menggunakan senyawa multifungsi secara alami dan memiliki berat molekul rendah seperti glutaradehida. Terdapat beberapa perbedaan metode untuk memproduksi enzim terimobilisasi dengan reagen multifungsi seperti pada Gambar 3.1. Enzim dapat bereaksi dengan reagen multifungsi saja sehingga mengalami persilangan ikatan antarmolekul oleh reagen untuk menghasilkan senyawa yang tidak larut air. Metode lain adalah dengan menjerap enzim pada permukaan senyawa yang tidak larut air, kemudian dilapisi oleh permukaan aktif dan diikuti oleh senyawa yang bersilangan untuk meningkatkan matrik.



Gambar 3.1. Beberapa perbedaan produksi enzim terimobilisasi dengan reagen multifungsi (a) enzim diadsorb pada permukaan support aktif diikuti cros-linking. (b) grup fungsional ditempatkan pada permukaan support untuk bereaksi secara kovalen dengan enzim, (c) enzim ditempatkan menyilang secara intermolekuler. (Dutta, 2008)

### 3.1.2. Metode Fisika

#### a. *Adsorption*

Metode ini menggunakan proses penyerapan reversibel. Perbedaan antara penggunaan sel dan enzim pada metode ini adalah pada sel yang diikat menggunakan sekat multipoint sehingga lebih kuat terhadap sorbent.

Kelebihan dari metode ini adalah:

1. Prosedur imobilisasi mudah
2. Memungkinkan untuk pemisahan dan purifikasi enzim saat imobilisasi
3. Enzim tidak mudah terdeaktivasi karena penjerapan
4. Proses adsorpsi adalah reversibel

Sedangkan kelemahan metode ini adalah:

1. kekuatan ikatan matrix enzim adalah rendah
2. Senyawa imobilisasi sangat sensitif terhadap cairan ber pH, ber ion, dan sensitif terhadap temperatur
3. Jumlah enzim yang digunakan dalam imobilisasi sangat sedikit

### ***b. Entrapment***

Metode entrapment ini terdiri atas penjeratan komponen aktif secara fisik pada film, gel, fiber, coating dan enkapsulasi. Metode ini dapat digunakan dengan cara mencampur sel dengan polimer matrik sehingga dihasilkan struktur yang dapat menjerat sel. Kelebihan dari metode ini adalah didapatkannya area permukaan yang lebih luas antara substrat dan sel, dengan volume yang lebih kecil dan kecenderungan imobilisasi yang simultan. Kelemahan metode ini terletak pada ketidakaktifan sel selama mikroenkapsulasi sehingga dibutuhkan konsentrasi sel yang lebih tinggi.

### ***c. Imobilisasi afinitas***

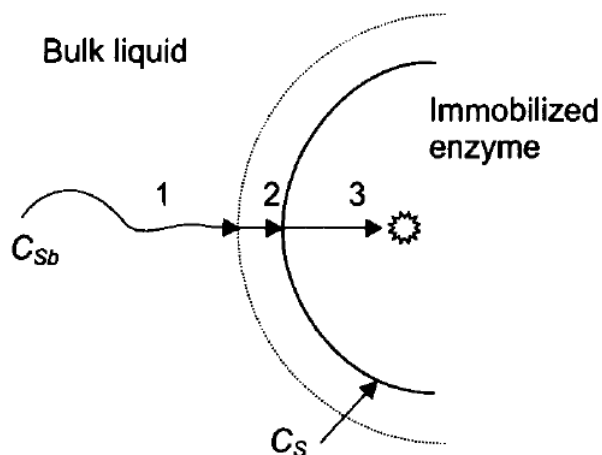
Metode ini didasarkan pada prinsip afinitas kromatografi. Imobilisasi afinitas ini tidak dipengaruhi reaksi kimia antara matrik dan sel kecuali untuk material absorbent. Selain itu, harus diperhatikan struktur matrik yang dapat mengikat permukaan sel. Metode ini biasanya digunakan untuk sel yang memiliki karakteristik yang sensitif.

## **3.2. Efek Transfer Masa**

Enzim yang terimobilisasi dapat menghasilkan problem baru yakni pada transfer massa karena besarnya partikel enzim yang terimobilisasi atau karena inklusi enzim dalam matrix polimer. Jika kita mengikuti hipotesa yang ada, maka terdapat tiga kemungkinan enzim terimobilisasi dapat bereaksi dengan cairan di reaktor, yakni

1. Transfer dari cairan ke lapisan cair yang melapisi sel enzim terimobilisasi
2. difusi melalui lapisan cairan
3. difusi dari permukaan partikel ke situs aktif enzim melalui bagian inert.

Langkah 1 dan 2 adalah kecenderungan transfer masa external, sedangkan langkah 3 adalah kecenderungan transfer massa intra-partikel.



Gambar 3.2. Diagram skema substrat bereaksi dengan enzim terimobilisasi (Dutta, 2008)

### 3.2.1. Ketahanan Transfer Masa Eksternal

Jika enzim diimobilisasi pada permukaan yang tidak larut pada suatu senyawa, maka bagian yang memungkinkan terjadi mekanisme adalah pada langkah 1 dan 2. Kecepatan transfer massa adalah proporsional terhadap driving force, perbedaan konsentrasi,

$$N_S = k_S A (C_{Sb} - C_S) \dots\dots\dots (3.1.)$$

di mana  $C_{Sb}$  dan  $C_S$  adalah konsentrasi substrat pada larutan dan pada permukaan enzim terimobilisasi (Gambar 3.2.). Sedangkan  $k_S$  adalah koefisien transfer masa (panjang/waktu) dan  $A$  adalah area permukaan dari satu partikel enzim yang terimobilisasi.

Selama reaksi enzimatik pada enzim terimobilisasi, kecepatan transfer substrat adalah setara dengan konsumsi substrat. Oleh karenanya, jika reaksi enzimatik dapat dinyatakan dengan Michaelis Menten, maka

$$r_p = k_S a (C_{Sb} - C_S) = \frac{r_{max} C_S}{K_M + C_S} \dots\dots\dots (3.2.)$$

di mana  $a$  adalah area luas total per unit volume dari larutan yang bereaksi. Persamaan ini menunjukkan hubungan antara konsentrasi substrat pada larutan dengan jumlah besar dan

## Dasar-dasar Bioproses

pada permukaan enzim yang terimobilisasi. Persamaan 3.2. dapat dijabarkan lagi dalam bentuk tak berdimensi

$$\frac{1-X_s}{N_{Da}} = \frac{\beta x_s}{1+\beta x_s} \dots\dots\dots (3.3.)$$

di mana  $x_s = C_s/C_{sb}$

$$N_{Da} = r_{max}/k_s a C_{sb} \dots\dots\dots (3.4)$$

$N_{Da}$  disebut sebagai Damkohler number, yang menyatakan rasio maksimum kecepatan reaksi terhadap kecepatan transfer massa maksimum. Berdasarkan nilai  $N_{Da}$ , persamaan 3.2. dapat disederhanakan dengan persyaratan,

1. Jika  $N_{Da} \ll 1$ , kecepatan transfer massa akan sangat lebih besar dari kecepatan reaksi dan keseluruhan reaksi dikontrol oleh reaksi enzim

$$r_p = \frac{r_{max} C_{sb}}{K_M + C_{sb}} \dots\dots\dots (3.5.)$$

2. Jika  $N_{Da} \gg 1$ , kecepatan reaksi lebih besar dari kecepatan transfer massa dan keseluruhan reaksi dikontrol oleh kecepatan transfer massa pada reaksi orde satu

$$r_p = k_s a C_{sb} \dots\dots\dots (3.6.)$$

Untuk mengamati perkembangan kecepatan reaksi yang rendah akibat resistensi transfer massa, kita dapat mengetahuinya dengan menggunakan rumus faktor efektivitas,  $n$ , yakni

$$n = \frac{\text{kecepatan reaksi aktual}}{\text{kecepatan yang tidak terlihat oleh difusi}} \dots\dots\dots (3.7.)$$

Kecepatan reaksi aktual di sini berdasarkan model external transfer massa yang dibatasi, sesuai persamaan 3.2. Kecepatan yang diperoleh tanpa resistensi transfer massa pada interface adalah sesuai persamaan 3.5. dengan penggantian  $C_s$  oleh  $C_{sb}$ . Maka dari itu diperoleh keseluruhan rumus,

$$\eta = \frac{\frac{r_{\max} C_S}{K_M + C_S}}{\frac{r_{\max} C_{Sb}}{K_M + C_{Sb}}} = \frac{\frac{\beta x_S}{1 + \beta x_S}}{\frac{\beta}{1 + \beta}} \dots\dots\dots (3.8)$$

di mana faktor efektivitas adalah fungsi dari  $x_S$  dan  $\beta$ . Jika  $x_S$  adalah setara dengan 1, maka konsentrasi pada permukaan,  $C_S$ , adalah setara dengan konsentrasi bulk,  $C_{Sb}$ .

Substitusi  $x_S$  menjadi 1 pada persamaan di atas menghasilkan  $n=1$ , yang berarti tidak ada transfer massa. Sedangkan jika  $x_S$  mendekati nol,  $n$  juga akan mendekati nilai nol. Hal ini sering terjadi jika kecepatan transfer massa sangat rendah dibanding kecepatan reaksinya.

### 3.2.2. Resistensi Transfer Massa Internal

Jika enzim diimobilisasi oleh kopolimerisasi atau metode mikroenkapsulasi, maka resistensi transfer massa intrapartikel dapat berimbas pada kecepatan reaksi enzimatik. Untuk mendapatkan rumus yang menggambarkan mekanisme tersebut, kita akan membuat beberapa asumsi, yakni:

1. Reaksi berlangsung pada setiap tempat pada enzim yang terimobilisasi, dan kinetika reaksi adalah sama jika diobservasi pada enzim tanpa imobilisasi.
2. Transfer massa melalui enzim terimobilisasi terjadi melalui difusi molekul
3. Tidak ada hambatan pada transfer massa pada permukaan luar enzim yang terimobilisasi
4. Bentuk enzim yang terimobilisasi adalah bulat.

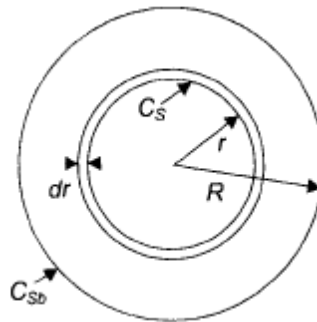
Model yang dikembangkan dari asumsi tersebut disebut sebagai model terdistribusi.

Pertama, kita tentukan persamaan diferensial yang menyatakan hubungan antara konsentrasi substrat dan jarak radial pada enzim terimobilisasi. Neraca massa untuk bentuk bola dengan ketebalan  $dr$  dinyatakan pada Gambar 3.3.

$$\text{input-output+produk=akumulasi} \dots\dots\dots (3.9)$$

$$4\pi \left\{ \begin{aligned} (r+dr)^2 D_s \left[ \frac{dC_s}{dr} + \frac{d}{dr} \left( \frac{dC_s}{dr} \right) dr \right] \\ - r^2 D_s \frac{dC_s}{dr} + (r^2 dr) r_s \end{aligned} \right\} = 4\pi r^2 dr \frac{dC_s}{dt} \dots\dots\dots(3.10)$$

di mana  $D_s$  adalah difusifitas substrat ke dalam matrix imobilisasi



Gambar 3.3. Neraca substrat dalam enzim terimobilisasi (Dutta, 2008)

Untuk kondisi steady state, perubahan konsentrasi substrat,  $dC_s/dt$ , adalah setara dengan nol. Setelah dilakukan penyederhanaan rumus, maka akan kita peroleh rumus orde dua persamaan diferensial menjadi

$$D_s \left( \frac{d^2 C_s}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_s}{dr} \right) + r_s = 0 \dots\dots\dots(3.11)$$

Persamaan 3.11. dapat diselesaikan dengan mensubstitusi  $r_s$  dengan nilai yang sesuai kondisi.

### 3.3.Kinetika Orde Nol

Diasumsikan bahwa kecepatan konsumsi substrat adalah konstan (orde nol), dengan kondisi substrat:

$$\begin{aligned} r_s &= -k_0 \text{ jika } C_s > 0 \\ r_s &= 0 \text{ jika } C_s < 0 \end{aligned} \dots\dots\dots(3.12)$$



Pendekatan lain adalah jika  $K_M \ll C_S$  untuk kinetika Michaelis Menten, dengan kasus  $k_0 = r_{\max}$ .

dengan substitusi persamaan 3.12 ke dalam persamaan 3.11 kita mendapatkan persamaan

$$\frac{d^2 C_S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_S}{dr} - \frac{k_0}{D_S} = 0 \quad \text{for } C_S > 0 \quad \dots\dots\dots(3.13)$$

Kondisi batas (boundary condition, B.C.) untuk persamaan tersebut

$$\begin{array}{ll} \frac{dC_S}{dr} \longrightarrow 0 & r \longrightarrow R_C \\ C_S = C_{Sb} & r = R \end{array} \quad \dots\dots\dots(3.14)$$

persamaan 3.13 menjadi

$$\frac{d^2 \alpha}{dr^2} = \frac{k_0}{D_S} r \quad \dots\dots\dots(3.15)$$

dengan mengintegrasikan persamaan 3.15 dua kali terhadap r, kita mendapatkan

$$\alpha = \frac{1}{6} \frac{k_0}{D_S} r^3 + C_1 r + C_2 \quad \dots\dots\dots(3.16)$$

Sehingga

$$C_S = \frac{1}{6} \frac{k_0}{D_S} r^2 + C_1 + \frac{C_2}{r} \quad \dots\dots\dots(3.17)$$

dengan menggunakan kondisi batas persamaan 3.14 ke dalam 3.17, menghasilkan

$$C_1 = C_{Sb} - \frac{1}{6} \frac{k_0}{D_S} R^2 - \frac{1}{3} \frac{k_0 R_C^3}{D_S R} \quad \dots\dots\dots(3.18)$$

$$C_2 = \frac{1}{3} \frac{k_0}{D_S} R^3 \quad \dots\dots\dots(3.19)$$

Sehingga persamaan 3.13 menjadi

$$\frac{C_S}{C_{Sb}} = \frac{k_0}{6 C_{Sb} D_S} \left[ \left( r^2 - R^2 \right) - 2 R_c^3 \left( \frac{1}{R} - \frac{1}{r} \right) \right] + 1 \quad \dots\dots\dots(3.20)$$

Persamaan 3.20 hanya valid pada  $C_s > 0$ . Radius kritis dengan nilai  $C_s$  adalah nol, dapat diselesaikan dengan persamaan

$$(R_c^2 - R^2) - 2R_c^3 \left( \frac{1}{R} - \frac{1}{R_c} \right) + \frac{6C_{sb}D_s}{k_0} = 0 \quad \dots\dots\dots(3.21)$$

Sedangkan untuk faktor efektivitas rasio laju reaksi aktual terhadap laju reaksi jika tidak diperlambat oleh difusi adalah

$$\eta = \frac{(\frac{4}{3})\pi(R^3 - R_c^3)k_0}{(\frac{4}{3})\pi R^3 k_0} = 1 - \left( \frac{R_c}{R} \right)^3 \quad \dots\dots\dots(3.22)$$

### **3.4. Kinetika Orde satu**

Jika kecepatan konsumsi substrat adalah reaksi orde satu terhadap konsentrasi substrat,

$$r_s = -kC_s \dots\dots\dots(3.23)$$

dengan substitusi 3.23 ke 3.11 dan konversi ke bentuk tak berdimensi, kita akan memperoleh

$$\frac{d^2 x_s}{d\dot{r}^2} + \frac{2}{\dot{r}} \frac{dx_s}{d\dot{r}} - 9\phi^2 x_s = 0 \quad \dots\dots\dots(3.24)$$

di mana

$$\begin{aligned} x_s &= \frac{C_s}{C_{sb}} \\ \dot{r} &= \frac{r}{R} \\ \phi &= \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k}{D_s}} \end{aligned} \quad \dots\dots\dots(3.25)$$

dan  $\theta$  disebut sebagai modulus Thiele, yang menyatakan kecepatan reaksi relatif terhadap kecepatan difusi. Persamaan 3.24, dengan kondisi batas

$$\begin{array}{ll} x_s \text{ is bounded} & \text{as } \dot{r} \rightarrow 0 \\ x_s = 1 & \text{at } \dot{r} = 1 \end{array} \dots\dots\dots(3.26)$$

menghasilkan fungsi  $C(r)$

Untuk mengkonversi persamaan 3.24 ke bentuk persamaan sederhana, kita nyatakan  $\alpha = rx_s$ , sehingga persamaan diferensial menjadi

$$\frac{d^2 \alpha}{d\dot{r}^2} - 9\phi^2 \alpha = 0 \dots\dots\dots(3.27)$$

sehingga penyelesaian umum persamaan diferensial ini adalah

$$\alpha = C_1 \cosh 3\phi \dot{r} + C_2 \sinh 3\phi \dot{r} \dots\dots\dots(3.28)$$

atau

$$x_s = \frac{1}{\dot{r}} (C_1 \cosh 3\phi \dot{r} + C_2 \sinh 3\phi \dot{r}) \dots\dots\dots(3.29)$$

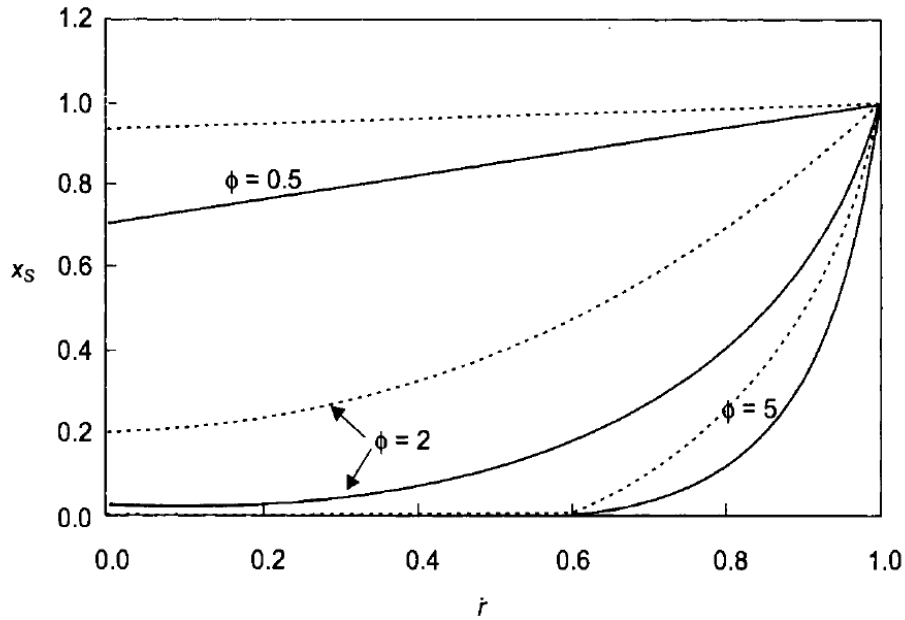
Karena  $x_s$  harus dibatasi sebagai pendekatan  $r = 0$  berdasarkan kondisi batas pertama, kita harus memilih  $C_1=0$ . Kondisi batas kedua membutuhkan  $C_2 = 1/\sinh 3\theta$ , menghasilkan,

$$x_s = \frac{\sinh 3\phi \dot{r}}{\dot{r} \sinh 3\phi} \dots\dots\dots(3.30)$$

yang menyatakan seberapa besar perubahan konsentrasi substrat sebagai fungsi jarak radial pada enzim terimobilisasi.

Gambar 3.4. menunjukkan profil konsentrasi substrat terhadap jarak radial seperti prediksi persamaan 3.30. Untuk nilai modulus Thiele yang rendah, ( $0 \leq 1$ ), kecepatan reaksi enzim adalah lambat jika dibandingkan dengan kecepatan difusi.

Maka dari itu, substrat terdifusi ke dalam inti partikel, yang menghasilkan distribusi konsentrasi yang dipengaruhi oleh lokasi radial dari partikel. Sedangkan, untuk nilai yang lebih tinggi dari modulus ( $0 \geq 5$ ), kecepatan reaksi lebih cepat dari kecepatan difusi, sehingga sebagian besar substrat dikonsumsi dekat dengan permukaan partikel. Jika  $0=5$ , konsentrasi substrat pada  $r < 0,6$  adalah bernilai nol.



Gambar 3.4. Profil konsentrasi substrat dengan prediksi radial dengan kinetika orde satu (garis penuh) dan kinetika Michaelis Menten (garis putus) (Dutta, 2008)

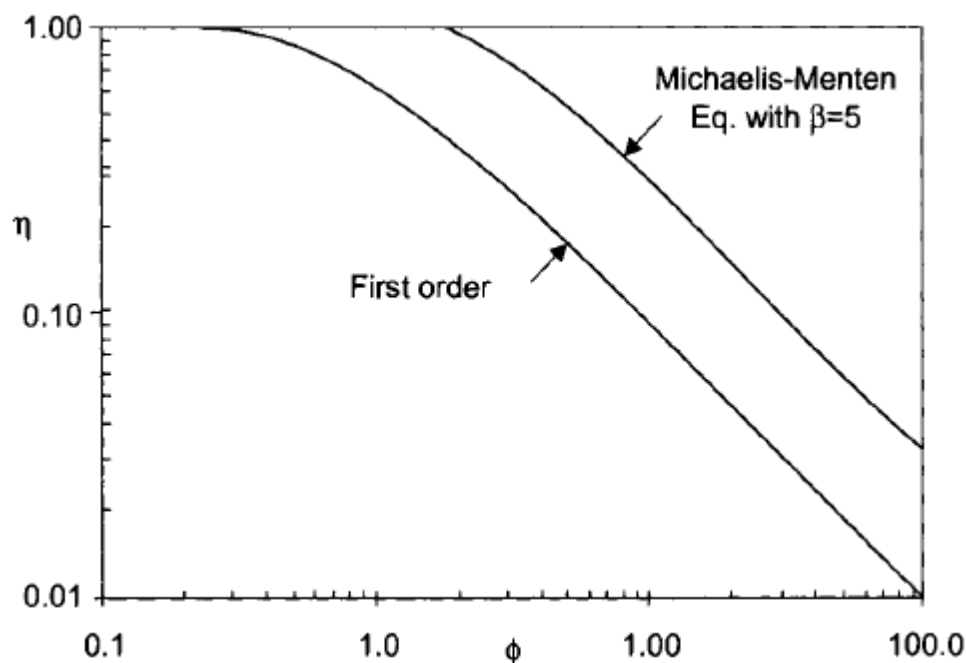
Kecepatan reaksi aktual dengan pembatas difusivitas memiliki nilai yang sama dengan kecepatan transfer massa pada permukaan enzim terimobilisasi, sementara kecepatan dinyatakan dengan  $kC_{sb}$  dengan kondisi kecepatan tidak dipengaruhi oleh difusivitas pori. Efisiensi dapat dinyatakan dengan

$$\eta = \frac{\frac{A_p}{V_p} D_s \frac{C_{sb}}{R} \frac{dx_s}{dr} \Big|_{r=1}}{kC_{sb}} \quad \dots\dots\dots(3.31)$$

di mana  $A_p$  dan  $V_p$  adalah area permukaan dan volume dari enzim terimobilisasi. Maka dari itu, jika dilakukan diferensiasi persamaan 3.30 dengan fungsi  $r$  dan mensubstitusikan hasilnya ke persamaan 3.31, akan menghasilkan

$$\eta = \frac{3\phi \coth 3\phi - 1}{3\phi^2} \quad \dots\dots\dots(3.32)$$

Gambar 3.5. adalah modulus Thiele yang mempengaruhi faktor efektivitas partikel bola terimobilisasi. Jika  $0 < 1$ , faktor efektivitas akan mendekat 1, yang menunjukkan bahwa kecepatan reaksi tidak diperlambat oleh difusifitas. Lain halnya dengan nilai  $0 > 1$ , faktor efektivitas adalah berbanding terbalik dengan modulus thiele.



Gambar 3.5. Efek modulus Thiesel terhadap faktor efektivitas partikel bola terimobilisasi untuk kinetika orde satu dan kinetika Michaelis Menten dengan  $\beta = 5$ . Modulus Thieles untuk kinetika orde satu adalah  $(\frac{R}{3})\sqrt{k/D_s}$  dan Kinetika Michaelis Menten  $(\frac{R}{3})\sqrt{r_{max}/D_s K_M}$  (Dutta, 2008)

### 3.5. Kinetika Michaelis Menten

Jika kecepatan konsumsi substrat dinyatakan dalam bentuk Michaelis Menten,

$$r_S = \frac{-r_{\max} C_S}{K_M + C_S} \dots\dots\dots(3.33)$$

kemudian kita substitusikan persamaan 3.33 ke dalam persamaan 3.11. dan mengubahnya ke bentuk tak berdimensi, maka kita dapatkan

### Dasar-dasar Bioproses

$$\frac{d^2 x_s}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dx_s}{dr} - 9\phi^2 \frac{x_s}{1 + \beta x_s} = 0 \quad \dots\dots\dots(3.34)$$

di mana  $\beta$  adalah  $C_{sb}/K_M$  dan modulus Thiele  $\theta$  lebih sedikit berbeda dari kinetika orde satu, dengan rumus

$$\phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{r_{\max}}{D_s K_M}} \quad \dots\dots\dots(3.35)$$

Persaman 3.34 tidak bisa dinyatakan dalam bentuk analitis karena persamaan diferensial non linier. Persamaan tersebut dapat diselesaikan oleh beberapa teknik tertentu seperti pemodelan komputer.

Gambar 3.5.menunjukkan profil konsentrasi substrat saat  $b=5$ . Faktor efektivitas untuk pendekatan michaelis menten dapat dinyatakan dengan

$$\eta = \frac{\frac{A_p}{V_p} D_s \frac{C_{sb}}{R} \left. \frac{dx_s}{dr} \right|_{r=1}}{\frac{r_{\max} C_{sb}}{K_M + C_{sb}}} \quad \dots\dots\dots(3.36)$$

### 3.6. Difusivitas Efektif dalam Gel Biologis

Beberapa data difusivitas transfer massa perlu diketahui. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk memperoleh hasil difusivitas tersebut seperti difusivitas untuk enzim terimobilisasi pada gelatin, agar, agarosa, dan sebagainya.

Tabel 3.1. Difusivitas Efektif dari larutan dalam gel biologis pada fase cair (Dutta, 2008)

Larutan	Gel	Konsentrasi (%w)	Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )	Difusivitas ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
Glukosa	Ca Alginat	2	25	$6,10 \times 10^{-10}$
Ethanol	Ca Alginat	2	25	$1,00 \times 10^{-9}$
Sukora	Gelatin	0	5	$2,85 \times 10^{-10}$
Sukrosa	Gelatin	3,8	5	$2,09 \times 10^{-10}$
Sukrosa	Gelatin	7,6	5	$1.35 \times 10^{-10}$
Laktosa	Ca Algmat	2	30	$6,67 \times 10^{-10}$

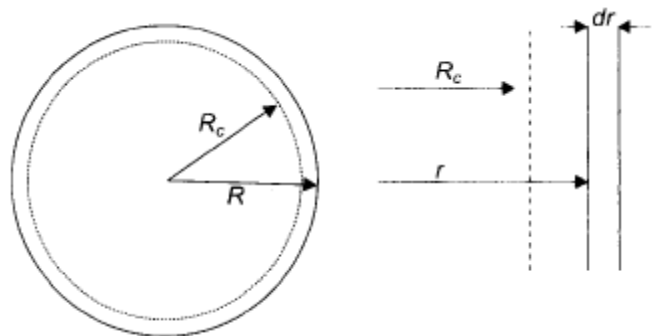
Gel adalah material semi solid berpori, yang terdiri dari makromolekul dan air. Struktur gel meningkatkan bagian panjang difusi, dan sebagai hasilnya, akan menurunkan kecepatan difusivitas. Beberapa nilai difusivitas efektif gel biologis dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Contoh 3.1.

Saat kecepatan difusi sangat lambat terhadap kecepatan reaksi, semua substrat akan dikonsumsi ke dalam permukaan tipis dekat dengan permukaan luar pada partikel bola. Tentukan persamaan efektivitas enzim terimobilisasi tersebut untuk kasus difusi yang paling mempengaruhi dengan menerapkan asumsi yang sama untuk model terdistribusi. Kecepatan konsumsi substrat dapat dinyatakan dengan pendekatan persamaan Michaelis Menten.

Jawab.

Karena semua substrat dikonsumsi pada permukaan tipis, kita dapat mengasumsikan bahwa permukaan memiliki bentuk yang rata. Dalam hal ini kita nyatakan bahwa kontrol volume ditentukan oleh elemen pada  $r$  dengan ketebalan  $dr$ , seperti Gambar 3.6.



Gambar 3.6. Model difusi imobilisasi enzim bentuk bola

Neraca massa untuk volume kontrol pada steady state adalah

$$AD_S \left[ \frac{dC_S}{dr} + \frac{d}{dr} \left( \frac{dC_S}{dr} \right) dr \right] - AD_S \frac{dC_S}{dr} + A(dr)r_S = 0 \quad \dots\dots\dots(3.42)$$

## Dasar-dasar Bioproses

setelah mengganti  $r_s$  dengan persamaan Michaelis Menten pada persamaan 3.42., kita memperoleh penyederhanaan menjadi

$$D_s \frac{D^2 C_s}{dr^2} = \frac{r_{\max} C_s}{K_M + C_s} \dots\dots\dots(3.43)$$

yang dapat diselesaikan dengan metode numerik. Namun dalam kasus ini kita tidak dituntut untuk menyelesaikan persamaan tersebut, yang kita selesaikan adalah mendapatkan persamaan untuk nilai efektivitas. Untuk menyelesaikannya kita memerlukan  $dC_s/dr$  pada  $r=R$ , karena

$$\eta = \frac{\frac{A_p}{V_p} D_s \left. \frac{dC_s}{dr} \right|_{r=R}}{\frac{r_{\max} C_{sb}}{K_M + C_{sb}}} \dots\dots\dots(3.44)$$

persamaan 3.43 adalah sama seperti

$$\frac{D_s}{2} \frac{d}{dC_s} \left( \frac{dC_s}{dr} \right)^2 = \frac{r_{\max} C_{sb}}{K_M + C_s} \dots\dots\dots(3.45)$$

maka dari itu, dengan mengintegrasikan persamaan 3.45 kita mendapatkan

$$\begin{aligned} \left. \frac{dC_s}{dr} \right|_{r=R} &= \left[ \frac{2r_{\max}}{D_s} \int_0^{C_{sb}} \left( \frac{C_s}{K_M + C_s} \right) dC_s \right]^{1/2} \\ &= \frac{2r_{\max}}{D_s} K_M [\beta - \ln(1 + \beta)]^{1/2} \dots\dots\dots(3.46) \end{aligned}$$

Substitusi persamaan 3.46 ke persamaan 3.44 sehingga menghasilkan persamaan

$$\eta = \frac{\sqrt{2}}{\phi} \frac{(1 + \beta)}{\beta} [\beta - \ln(1 + \beta)]^{1/2} \dots\dots\dots(3.47)$$



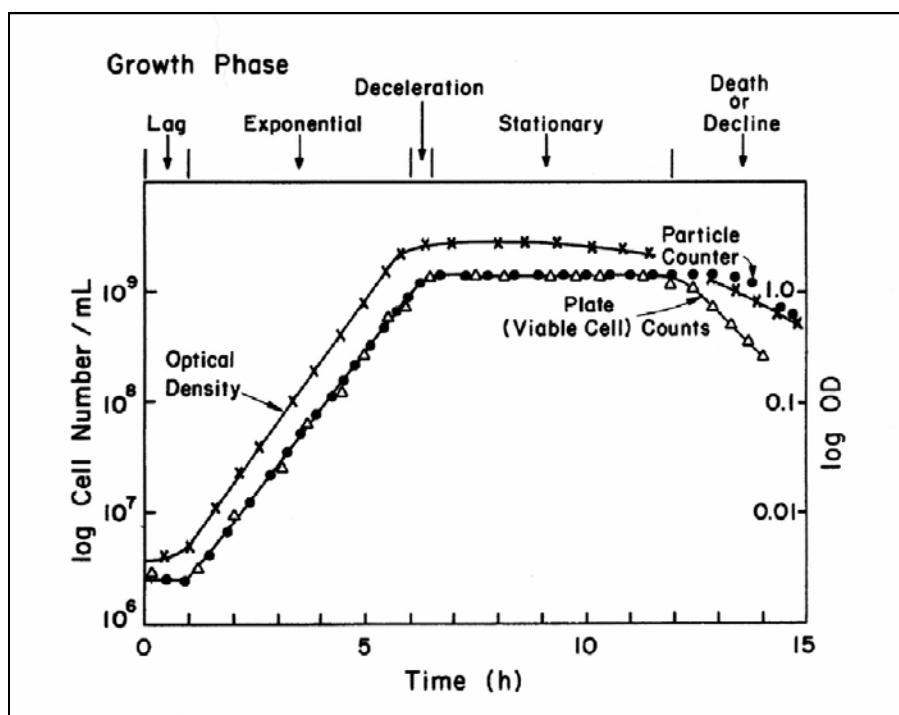
## BAB IV

### PERTUMBUHAN SEL

Studi mengenai pertumbuhan sel merupakan bagian terpenting dalam bioproses karena menyangkut fase kehidupan sel, laju pertumbuhan, dan kinetiknya. Lebih jauh lagi, dalam melakukan desain suatu proses, termasuk desain reaktor, kita membutuhkan data-data mengenai pertumbuhan sel.

#### 4.1. Fase Pertumbuhan Sel

Fase pertumbuhan sel secara batch biasanya dibagi dalam lima fase. yakni fase lag, fase logaritmik, fase penurunan, fase stasioner, dan fase kematian.



Gambar 4.1. Fase pertumbuhan sel (Pauline, 1995).

##### a. Fase Lag

Fase ini merupakan fase awal dari pertumbuhan sel. Pada fase ini sel mengalami adaptasi terhadap lingkungan barunya. Dalam prosesnya, terjadi metabolisme sel: terjadi sintesis enzim yang baru, terjadi peningkatan massa sel dan volume sel,

namun tidak meningkatkan jumlah sel. Fase lag merupakan fase kritis dari pertumbuhan sel, apakah suatu proses pertumbuhan berhasil atau gagal.

**b. Fase Logaritmik**

Fase logaritmik juga disebut dengan fase eksponensial. Pada fase ini, sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya dan menggandakan diri dengan sangat cepat dalam hitungan eksponensial. Dalam fase ini, semua komponen sel tumbuh pada kecepatan yang sama, nutrisi masih dalam keadaan ekses. Laju pertumbuhan spesifik biasa dihitung dari fase ini.

neraca massa sel dalam kultur batch dinyatakan dengan

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{net} X, \quad X = X_0 \text{ pada } t = 0$$

integrasi persamaan di atas menghasilkan

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{net} t, \text{ atau } X = X_0 e^{\mu_{net} t}$$

di mana X dan  $X_0$  adalah konsentrasi sel pada waktu t dan t=0,  $\mu_{net} = \mu_r = \mu_m$

$\mu_m$  adalah kecepatan spesifik maksimum (1/waktu)

Pada fase eksponensial juga dapat dihitung waktu penggandaan (doubling time), yakni waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan sel mikroba.

$$\tau_d = \frac{\ln X / X_0}{\mu_{net}} = \frac{\ln 2}{\mu_{net}} = \frac{0.693}{\mu_{net}}$$

**c. Fase Penurunan Kecepatan**

Pada fase ini terjadi penurunan kecepatan dari fase logaritmik dengan waktu yang sangat singkat. Selama fase penurunan, terjadi fenomena berkurangnya satu atau lebih dari nutrisi penting, terjadi akumulasi produk samping yang merupakan racun bagi sel. (Seperti etanol dalam fermentasi yeast), sel juga mengalami perubahan struktur untuk meningkatkan ketahanan hidup.

**d. Fase Stasioner**

Fase ini terjadi seiring berkurangnya nutrisi substrat, meningkatnya produk metabolik sekunder, dan semakin banyaknya sel yang mati. Pada fase ini, laju pertumbuhan setara dengan laju kematian, tidak ada net growth dari populasi

organisme, sel mengeluarkan lebih banyak metabolisme aktif untuk memproduksi metabolik sekunder. Contoh metabolik sekunder adalah antibiotik, pigmen, dll. Dalam fase ini juga dimungkinkan terjadi lisis pada sel, dan viabilitas sel akan menurun.

e. Fase Kematian

Fase kematian ditandai dengan banyaknya sel yang mati dibandingkan dengan sel yang masih hidup. Hal ini disebabkan berkurangnya nutrisi dan metabolisme racun dari hasil reaksi samping (by-product).

$$\frac{dN}{dt} = -k_d' N$$

$k_d'$  adalah konstanta laju kematian sel orde satu.

Untuk menyederhanakan persepsi mengenai fase pertumbuhan sel, dapat kita lihat pada Tabel 4.1. sesuai laju pertumbuhan spesifiknya

Tabel 4.1. Fase pertumbuhan sel berdasarkan laju spesifik

Fase	Deskripsi	Laju spesifik
Lag	Sel beradaptasi dengan lingkungan baru, laju pertumbuhan sangat rendah	$\mu \approx 0$
Logaritmik / eksponensial	Dimulainya pertumbuhan. Pertumbuhan mencapai laju maksimum	$\mu < \mu_{max}$
Penurunan	Laju menurun seiring berkurangnya nutrisi Tidak ada laju pertumbuhan	$\mu \approx \mu_{max}$
Stasioner	Sel menurun	$\mu = 0$
Kematian		$\mu > \mu_{max}$

## 4.2. Pengamatan Pertumbuhan Sel

Dalam sistem biologi, laju pertumbuhan sel dapat dinyatakan sebagai peningkatan komponen kimia sel (Dutta, 2008). Hal ini berkaitan dengan kandungan senyawa kimia yang ada di dalam sel seperti glikogen, dan sebagainya. Pengamatan ini diperlukan untuk

## ***Dasar-dasar Bioproses***

mengetahui laju pertumbuhan sel itu sendiri. Sedangkan laju pertumbuhan sel merupakan salah satu informasi penting dalam melakukan desain bioreaktor.

### **4.2.1. Pengamatan Jumlah Sel.**

#### **a. Penghitungan Mikroskopis**

Metode ini umum digunakan untuk menghitung jumlah populasi sel di bawah mikroskop dengan menghitungnya menggunakan alat khusus. Ada dua tipe chamber yang digunakan untuk menghitung jumlah sel dalam bentuk cair:

- hemocytometer : alat ini umum digunakan untuk menghitung jumlah organisme dengan bentuk 3 mikron atau lebih besar.
- Petroff-Hausser : alat ini digunakan khusus untuk bakteri

Kedua lempengan tersebut memiliki marka garis tersendiri di permukaannya. Setiap garis mewakili kotak persegi dengan jarak dan luas tertentu sehingga dengan mengkalikannya dengan kedalaman cairan akan diketahui volume totalnya. Volume yang diperoleh merupakan perwakilan dari sampel keseluruhan. Metode ini umum dilakukan karena memiliki kelebihan

1. Peralatan yang dibutuhkan tidak rumit
2. Hasil yang diperoleh cepat
3. Dapat diketahui morfologi sel secara langsung

Sedangkan kelemahan metode ini adalah:

1. Terikutnya penghitungan sel mati sehingga perhitungan sel tidak valid
2. Metode ini tidak cocok digunakan dengan densitas yang sangat rendah
3. Sel yang berukuran sangat kecil sangat sukar dihitung
4. Pengamatan mata untuk satu orang dengan orang lain berbeda beda sehingga memungkinkan terjadi salah perhitungan sel
5. Metode ini tidak cocok digunakan untuk sel yang mudah terflukolasi seperti mycelium.

#### **b. Viable Plate Count**

Metode ini dapat mengetahui jumlah sel, membagi sel, dan mengumpulkan sel. Ada dua cara untuk menggunakan metode ini, yakni metode penyebaran

plate, dan metode penuangan plate. Metode penyebaran pada plate digunakan pada saat volume cairan sel tidak lebih dari 0.1 ml dengan menuangkannya di atas permukaan agar. Sementara metode penuangan plate, sampel dimix dengan agar yang telah dilelehkan dan dituangkan bersama sama di atas plate yang telah steril. Plate diinkubasi hingga tumbuh koloni kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel. Dalam penghitungannya, hanya sel dengan bentuk sedang yang masuk dalam hitungan, tidak terlalu besar atau kecil.

c. Coulter Counter

Untuk menghindari kesukaran dalam perhitungan sel menggunakan mikroskop, metode alternatif yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan coulter counter. Teknik ini tidak hanya dapat menghitung jumlah sel namun juga ukuran sel. Kelemahan metode ini adalah adanya impuritas pada sel yang memungkinkan ikut terhitung. Metode ini sukar digunakan untuk menghitung sel yang berikatan dan organisme miselium.

4.2.2. Pengamatan Massa Sel

a. Sel Berat Kering

Berat kering dari suatu sel dapat diketahui dengan mengambil sebagian cairan sel kemudian memanennya dengan metode centrifugasi. Setelah supernatant dipisahkan, biomassa sel dicuci dengan air distilasi untuk menghilangkan zat terlarut. Suspensi disentrifugasi lagi kemudian diambil biomasanya dan dikeringkan pada oven pada kondisi tertentu. Hasil akhir dari biomassa sel ini kemudian ditimbang untuk mengetahui beratnya. Metode ini merupakan metode yang paling mudah untuk pengamatan kuantitatif. Namun metode ini juga mempunyai kelemahan seperti waktu yang dibutuhkan lama, dan mungkin terjadi perubahan struktur sel sehingga mempengaruhi hasil berat sel. Teknik ini umum digunakan untuk sel yang mudah tersuspensi dan memiliki densitas tinggi.

b. Instrumen Turbiditas

Metode lain yang umum digunakan untuk mengetahui massa sel adalah dengan turbiditas. Instrumen yang umum digunakan adalah spektrofotometer. Sampel sel cair dengan kepekatan tertentu dimasukkan ke dalam

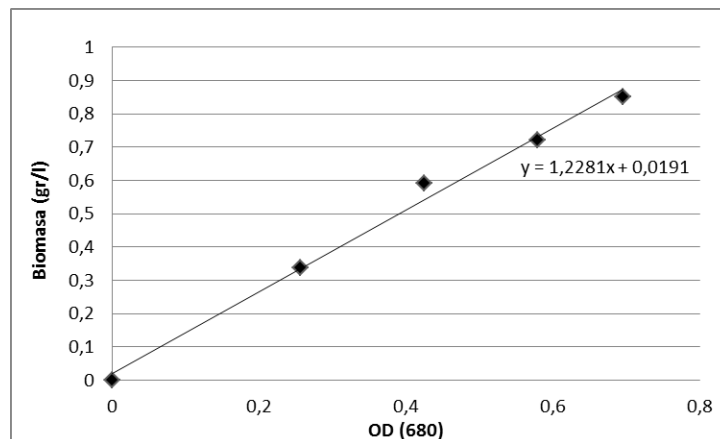
spektrofotometer dengan panjang gelombang cahaya yang telah diatur sesuai dengan karakteristik sampel. Cahaya akan melewati sampel dan diperoleh pembacaan optical density dengan panjang gelombang tertentu 600-700nm. Semakin banyak sel terdapat dalam sampel, maka cahaya yang lewat dari sampel akan semakin berkurang, dan optical density yang diperoleh semakin tinggi. Dalam instrumen spektrofotometer digunakan pembacaan A (absorbansi) di mana  $A = \log (I_0/I)$ . Absorbansi adalah logaritma dari rasio intensitas cahaya yang melewati sampel ( $I_0$ ) terhadap cahaya yang ditransmisikan oleh sampel ( $I$ ).

Metode ini juga memerlukan kurva kalibrasi untuk mengetahui hubungan linier antara optical density dan berat biomassa yang telah diperoleh pada konsentrasi tertentu. Sebagai contoh, dilakukan pemanenan mikroalga dengan data pada Tabel 4.2.:

Tabel 4.2. Contoh data hubungan OD vs biomassa mikroalga

Berat Kering Mikroalga Chlorella sp	Pembacaan Optical Density 680nm
0	0
0.34	0.256
0.59	0.425
0.72	0.58
0.85	0.696

dari data tersebut diperoleh hubungan regresi linier sesuai Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Contoh hubungan OD terhadap biomassa

sehingga persamaan tersebut dapat mewakili berapa berat kering yang diperoleh hanya dengan melakukan pembacaan optical density.

#### 4.2.3. Metode Tidak Langsung

Metode tidak langsung untuk mengetahui massa sel adalah berdasarkan stoikiometri untuk pertumbuhan dan pembentukan produk, yang dapat ditulis secara umum;

Sumber C + Sumber N + phosphat + O<sub>2</sub> →

massa sel + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + produk + panas

perubahan massa sel dapat dimonitor secara tidak langsung dengan mengamati konsumsi nutrien, pembentukan produk, komponen sel, panas yang terbentuk, atau kondisi fisik dari broth sel tersebut.

Konsumsi nutrien : Konsumsi nutrient penting untuk diketahui. Tidak semua nutrien juga dapat disintesis oleh sel dalam produk metabolis. Sulfat, phosphat, atau magnesium merupakan nutrien utama yang dapat digunakan untuk mengetahui neraca massa dalam produk metabolis. Sementara Jika massa sel yang diperlukan untuk diamati, maka sumber karbon merupakan senyawa utama dalam perhitungan tersebut.

Pembentukan Produk : Beberapa produk dibentuk setelah sel mencapai fase stasioner. Evolusi karbon dioksida dapat diamati dan dimasukkan dalam perhitungan stoikiometris dalam pertumbuhan sel.

Komponen Sel : Beberapa komponen sel seperti DNA, RNA, dan protein dapat dijadikan sebagai parameter dalam penentuan berat sel. Namun diperlukan ketelitian karena komponen tersebut mudah berubah.

Akumulasi Panas : Sel melepas panas ketika tumbuh. Panas pembakaran dari organisme adalah konstan dengan nilai tipikal 5 kcal/g. Jumlah panas yang dilepas tergantung pada efisiensi pemanfaatan energi dari karbon. Untuk itu, pengamatan panas dari hasil fermentasi dapat digunakan secara tidak langsung terhadap pertumbuhan sel. Namun total panas yang terakumulasi dalam sistem fermentor adalah kombinasi dari berbagai sumber panas seperti panas pembentukan dan panas dari pengadukan di fermentor, dan sebagainya.

Pengamatan pertumbuhan sel dengan mengetahui panas yang dihasilkan merupakan metode yang paling susah dilakukan sehingga perlu dilakukan evaluasi neraca energi untuk semua komponen yang ada di dalam fermentor.

Viskositas : Pertumbuhan miselium atau pembentukan polisakarida dapat meningkatkan viskositas dari cairan fermentasi. Maka dari itu, pengamatan viskositas cairan fermentasi sangat membantu dalam fermentasi komersial. Terkadang broth fermentasi menunjukkan kelakuan sifat non Newtonian, yang berimbas pada hasil pengukuran viskositas menjadi rumit (Dutta, 2008).

### **4.3.Kinetika Pertumbuhan Sel**

Kinetika pertumbuhan sel dapat dinyatakan dalam bentuk persamaan yang hampir sama dengan kinetika enzimatis.

#### **4.3.1. Pertumbuhan Batch**

Pada sesi sebelumnya telah dijelaskan mengenai fase pertumbuhan organisme dalam bentuk batch yang terdiri dari fase adaptasi hingga fase kematian. Selama fase pertumbuhan dan penurunan, kecepatan pertumbuhan sel secara umum dapat dinyatakan dengan persamaan:

$$r_x = \mu x \dots\dots\dots(4.1.)$$

di mana  $r_x$  adalah kecepatan produksi volumetrik biomassa (contoh  $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $x$  adalah konsentrasi sel yang terukur (contoh  $\text{kg}/\text{m}^3$ ), dan  $\mu$  adalah laju pertumbuhan spesifik dengan satuan  $1/\text{waktu}$  (contoh  $\text{s}^{-1}$ ).

Dalam sistem tertutup di mana pertumbuhan adalah faktor satu satunya yang berpengaruh terhadap konsentrasi sel,  $= \frac{dx}{dt}$ . Integrasi persamaan dapat dinyatakan dalam bentuk lain dengan kondisi pembatas  $x=x_0$  pada  $t=0$ , sehingga

$$x = x_0 e^{\mu t} \dots\dots\dots(4.2.)$$



di mana  $x_0$  adalah konsentrasi sel pada waktu ke-0. Persamaan tersebut merepresentasikan pertumbuhan eksponensial, sedangkan dalam bentuk logaritmik dapat dinyatakan sebagai

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \dots\dots\dots (4.3)$$

berdasarkan persamaan 4.3., plot antara  $\ln x$  terhadap waktu dapat memberi hasil garis lurus dengan slope  $\mu$ .

Laju pertumbuhan sel juga dapat dinyatakan dalam bentuk *doubling time*  $t_d$ . Dengan memodifikasi persamaan 4.3, di mana  $t=t_d$  adalah  $2x_0$ , maka diperoleh persamaan

$$2x_0 = x_0 e^{\mu t_d} \dots\dots\dots (4.4.)$$

atau dengan mengeliminasi  $x_0$ , menjadi

$$2 = e^{\mu t_d} \dots\dots\dots (4.5.)$$

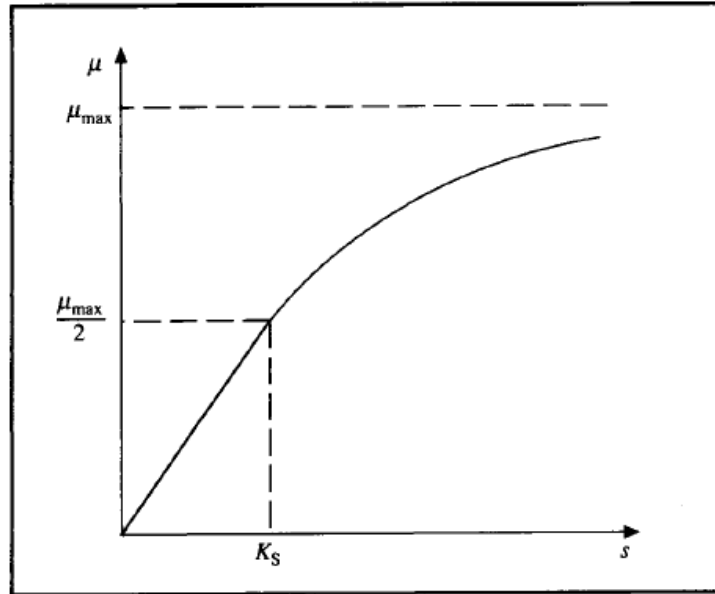
dengan modifikasi logaritmik diperoleh persamaan  $\ln 2 = \mu t_d$  atau  $t_d = \ln 2 / \mu$

#### 4.3.2. Efek Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat merupakan faktor penting dalam pertumbuhan organisme. Substrat yang paling berpengaruh dalam pertumbuhan biasanya adalah sumber karbon dan nitrogen. Persamaan yang mungkin dapat digunakan untuk menyatakan hal tersebut adalah persamaan Monod, homolog dari persamaan Michaelis-Menten

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{K_s + C_{S0}} \dots\dots\dots (4.6.)$$

$K_s$  adalah parameter intrinsik dari sistem substrat sel dengan satuan yang sama dengan konsentrasi substrat. Beberapa nilai  $K_s$  dapat dilihat pada Tabel 4.3. atau dengan membuat grafik hubungan antara substrat dengan laju pertumbuhan seperti pada Gambar 4.3.  $K_s$  dapat diperoleh setelah dilakukan plot sesuai persamaan 4.6., di mana nilai  $\frac{\mu_{max}}{2}$  akan memberikan nilai  $K_s$  setelah dilakukan plotting kurva  $s$  terhadap  $\mu$



Gambar 4.3. Hubungan antara konsentrasi substrat terhadap laju pertumbuhan dengan pemodelan Monod (Pauline, 1995)

Untuk beberapa nilai  $K_s$  dari organisme dan substratnya dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Nilai  $K_s$  untuk beberapa genus mikroorganisme dan substra yang digunakan (Pauline, 1995)

Mikroorganisme (Genus)	Substrat berpengaruh	$K_s$ (mg/l)
<i>Saccharomyces Escherichia</i>	Glukosa	25
	Glukosa	4
	Laktosa	20
<i>Aspergillus</i>	Phosphate	1.6
<i>Candida</i>	Glukosa	5
	Gliserol	4.5
<i>Pseudomonas</i>	Oksigen	0,042-0,045
	Methanol	0,7
<i>Klebsiella</i>	Methana	0,4
	Karbon dioksida	0,4
	Magnesium	0,56

4.3.3. Kinetika Produksi pada Kultur Sel (Pauline, 1995)

Produk fermentasi dapat diklasifikasikan berdasarkan hubungan antara sintesis produk dengan akumulasi energi yang dihasilkan dalam sel. Tiga tipe metabolit tersebut adalah;

- a. Produk kontak langsung dengan pembentukan energi di dalam sel. Contoh produk: ethanol, asam asetat, aseton, asam glukonak, butanol, asam laktat, produk lain dari fermentasi anaerob.
- b. Produk tidak kontak secara langsung dengan pembentukan energi. Contoh produk: Asam amino dan derivatnya, asam sitrat, dan nukleotid.
- c. Produk Antara, yakni produk di antara kontak secara langsung dan tidak kontak secara langsung terhadap pembentukan energi. Contoh produk: penisilin, vitamin, dan streptomycin.

Dalam hubungannya dengan tipe produksi tersebut, laju kecepatan pembentukan sel produk dapat dinyatakan sebagai fungsi konsentrasi biomassa

$$r_p = q_p x \dots\dots\dots (4.7.)$$

di mana  $r_p$  adalah kecepatan pembentukan produk volumetrik dengan unit contoh kg/m<sup>3</sup>/s,  $x$  adalah konsentrasi biomassa, dan  $q_p$  adalah pembentukan laju spesifik dari produk dengan unit 1/T. Berdasarkan hubungannya dengan metabolisme energi, kita dapat mengembangkan persamaan untuk  $q_p$  sebagai fungsi laju pertumbuhan dan parameter metaboliknya.

- Untuk produk kontak langsung dengan metabolisme energi, pertumbuhan merupakan fungsi yang paling membutuhkan energi dalam sel, sehingga jika produksi berhubungan dengan metabolisme energi, produk akan dibentuk jika terjadi pertumbuhan. Persamaan yang dapat mewakili adalah

$$r_p = Y_{px} r_x + m_p x \dots\dots\dots (4.8.)$$

pada persamaan tersebut,  $r_x$  adalah laju volumetrik pembentukan biomassa,  $Y_{px}$  adalah yield produk teoritis dari biomassa,  $m_p$  adalah laju spesifik dari

## Dasar-dasar Bioproses

pembentukan produk selama maintenance, dan  $x$  adalah konsentrasi biomassa.

Berdasarkan persamaan, nilai  $r_x$  adalah berbanding lurus dengan nilai  $\mu x$ ,

$$r_p = (Y_{px} \mu + m_p)x \dots\dots\dots(4.9.)$$

sehingga dari substitusi persamaan diperoleh persamaan baru untuk

$$q_p = Y_{px} \mu + m_p \dots\dots\dots(4.10)$$

- Untuk produk yang disintesis secara terpisah dan tidak kontak langsung terhadap pembentukan energi di dalam sel, terdapat kerumitan dalam menyatakan persamaan rumus yang mewakilinya karena menyangkut banyak faktor internal di dalam sel. Umumnya laju spesifik pembentukan produknya diperoleh dari uji laboratorium dengan pemodelan komputer.
- Untuk pembentukan produk yang berada di antara kontak dan tidak kontak dengan metabolisme energi sel, dapat menggunakan persamaan. Namun terkadang  $q_p$  adalah fungsi yang rumit sehingga juga diperlukan uji empiris yang diperoleh dari pemodelan komputer dan eksperimen.

### Contoh

#### *Doubling Time Hybridoma*

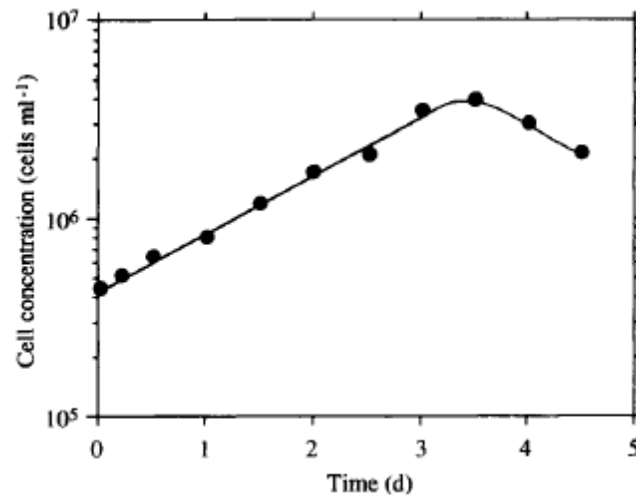
Suatu percobaan fermentasi di laboratorium diperoleh data percobaan sebagai berikut

Waktu (hari)	Konsentrasi sel (sel/ml x 10 <sup>-6</sup> )
0	0,45
0,2	0,52
0,5	0,65
1	0,81
1,5	1,22
2	1,77
2,5	2,13
3	3,55
3,5	4,02
4	3,77
4,5	2,20

- Tentukan laju pertumbuhan spesifik selama fase pertumbuhan
- Berapakah doubling time nya?

Jawab

- Data dibuat dalam bentuk grafik semi log, plot antara waktu (y) dengan konsentrasi sel (x)



dari grafik diketahui bahwa tidak ada waktu lag (adaptasi) sehingga laju pertumbuhan spesifik dari sel dapat dihitung dari hari pertama (hari ke-0), sedangkan pada hari ke- 3,5 telah terjadi penurunan sel.

Sesuai persamaan,  $\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0}$ , diperoleh hasil sebesar 0,67/hari.

- Dari persamaan  
 $td = \ln 2 / 0,67 = 1. \text{ hari}$

## **BAB V**

---

### **Fermentasi**

Kata fermentasi berasal dari bahasa latin, *fervere*, yang artinya mendidih. Arti ini cukup menjabarkan fenomena pendidihan dan keluarnya gelembung ketika terjadi suatu proses yeast bereaksi dengan sari buah di masa lalu untuk membuat khamir. Publikasi ilmiah mengenai fermentasi alkohol ditulis oleh Gay Lussac pada tahun 1810, diikuti oleh Theodore Schwan pada tahun 1837, dan Cagniard-Latour pada tahun 1838. Sedangkan pada tahun 1858, Louis Pasteur mempublikasikan bahwa fermentasi tidak hanya berhubungan dengan alkohol tapi juga asam laktat. Penelitian lebih dalam tentang fermentasi secara ilmiah pertama kali dilakukan oleh Louis Pasteur pada tahun 1861 dengan melakukan pembentukan alkohol dari gula oleh khamir dalam suasana anaerob. Beberapa peneliti kemudian mulai melakukan penelitian dan mengembangkan metode dari Pasteur untuk memperoleh fenomena yang terjadi secara ilmiah.

Secara segi biokimia, fermentasi dapat diartikan sebagai aktifitas mikroorganisme untuk memperoleh energi yang diperlukan untuk metabolisme dan pertumbuhan melalui pemecahan senyawa organik secara anaerob. Sedangkan pengertian secara umum, fermentasi adalah perubahan kimiawi dari suatu substrat organik menjadi suatu produk dengan menggunakan aktifitas metabolisme mikroorganisme baik secara anaerob maupun aerob dengan produk berupa biomassa, enzim, metabolit, atau produk transformasi.

Secara umum, hasil akhir fermentasi dibedakan menjadi fermentasi asam laktat/susu, dan fermentasi alkohol.

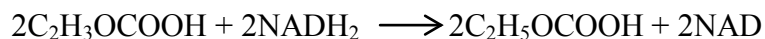
a. Fermentasi asam laktat

Fermentasi ini menghasilkan produk akhir berupa asam laktat dengan kondisi anaerob. Reaksi yang terjadi



proses yang terjadi

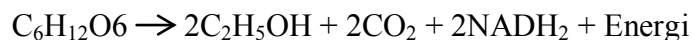
1. Glukosa  $\longrightarrow$  asam piruvat (proses glikolisis)
2. Dehidrogenasi asam piruvat yang membentuk asam laktat



b. Fermentasi alkohol

Beberapa mikroga mengalami peristiwa pembebasan energi karena piruvat telah diubah menjadi asam asetat dan  $\text{CO}_2$ . Selanjutnya asam asetat akan diubah menjadi alkohol.

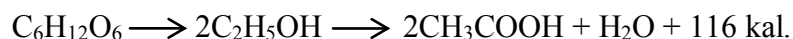
Reaksi:



c. Fermentasi asam cuka

Fermentasi asam cuka adalah contoh dari fermentasi aerob. Umumnya fermentasi ini dilakukan oleh bakteri asam cuka (*Acetobacter aceti*) dengan substrat ethanol.

Reaksi:



Secangkan berdasarkan teknik yang digunakan, fermentasi dapat dibedakan menjadi dua macam, yakni (i) fermentasi padat dan (ii) fermentasi cair.

a. Fermentasi Padat

Fermentasi padat a sering disebut SSF (solid state fermentation). Fermentasi ini memanfaatkan substrat dalam bentuk padatan seperti pulp kayu, biji-bijian, dedaunan, ampas tebu, dan beberapa sampah organik lain dalam bentuk padat. Keunggulan fermentasi ini adalah substrat dapat diperoleh dari limbah organik berupa biomassa sehingga mudah direcycle. Selain itu, teknik ini dapat mengontrol kehilangan nutrisi selama proses fermentasi. Pada teknik fermentasi ini, substrat dimanfaatkan dalam laju yang sangat lambat dan steady state, sehingga dibutuhkan waktu yang relatif lama.

SSF adalah teknik fermentasi yang sangat cocok digunakan untuk meningkatkan inokulum fungi dan organisme yang membutuhkan moisture yang rendah. Fermentasi ini jarang digunakan untuk fermentasi yang menggunakan bakteri. Contoh teknik SSF yang paling sering ditemui adalah fermentasi tempe, oncom, miso, natto, dan tape.

### **b. Fermentasi Cair**

Fermentasi cair biasa disebut SmF (submerged fermentation). SmF memanfaatkan substrat yang terlarut dalam cairan medium seperti molases, dan broth. Fermentasi ini cenderung memiliki reaksi yang lebih cepat dari SSF sehingga dibutuhkan kontrol substrat yang lebih ketat dan penambahan yang konstan. Kelebihan lain dari fermentasi ini adalah lebih mudah dalam pemisahan produk dan purifikasinya. Umumnya SmF juga lebih banyak digunakan untuk ekstraksi metabolisme sekunder yang hanya berlangsung dalam bentuk cair.

### **5.1. Sejarah Fermentasi**

Teknologi fermentasi telah banyak digunakan oleh orang-orang terdahulu seperti dalam pembuatan khamir, cuka, tape, tempe, kecap, yoghurt, keju, dan banyak makanan lain. Perkembangan industri teknologi fermentasi secara revolusioner diawali dengan didirikannya industri gliserol di Jerman dan industri aseton-butanol di Inggris pada perang dunia pertama. Perkembangan teknologi fermentasi semakin pesat ketika para peneliti menemukan teknik isolasi, penggunaan kultur murni, teknik kontrol lingkungan fermentasi seperti sterilisasi, pH, pengadukan, aerasi, dan sebagainya.

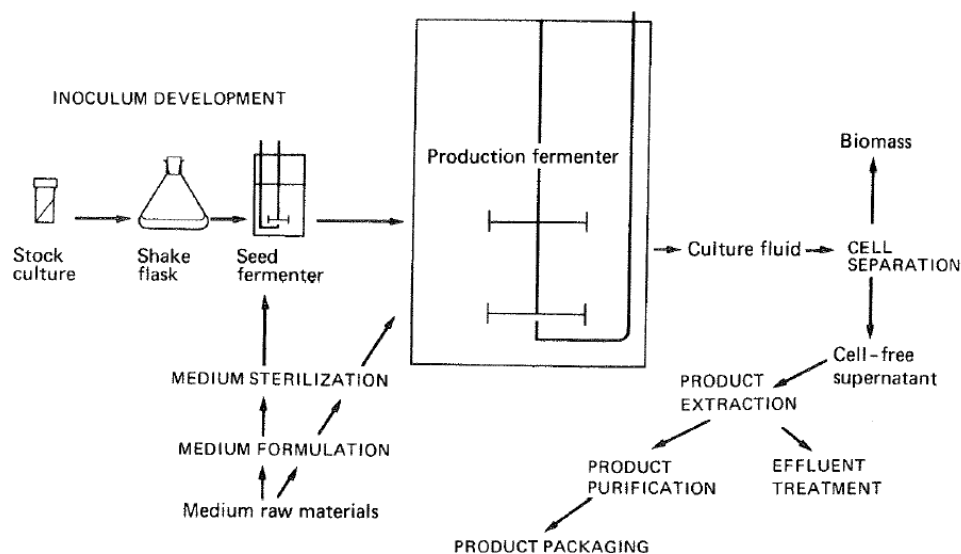
Johnson (1971) mencatat bahwa teknologi fermentasi digolongkan menjadi beberapa periode.

1. Periode Pasteur sampai dengan 1860, masih berupa kajian dan fermentasi yang dikontrol dengan sangat sederhana.
2. Periode 1860-1900, banyak industri fermentasi asam laktat dan alkohol seperti Clasbergs Brewery. Kontrol parameter hanya menggunakan thermometer, hydrometer, dan unit operasi berupa heat exchanger.
3. Periode 1900-1920, dimulainya industri fermentasi dengan menggunakan teknik manipulasi metabolisme pada industri gliserol, dan penggunaan fermentasi secara kontinyu.
4. Periode 1920-1940, revolusi teknologi fermentasi, penerapan teknik fermentor (bioreaktor) yang dilengkapi dengan pengaduk, aerasi, sterilisasi, dan kontrol. Mulai banyak digunakan kontrol pH dengan sistem on off, dan menggunakan



kontrol temperatur. Mulai banyak industri menggunakan sistem fed batch, dan kultur murni.

5. Periode 1940-1950, perkembangan teknologi fermentasi untuk enzim, obat, dan antibiotik seperti penisilin, streptomycin. Mulai digunakan sistem operasi dengan memperhatikan kualitas kontrol, mulai tumbuh fasilitas pilot plant.
6. Periode 1950-1960, dimulainya produksi asam amino secara massal, produksi steroid, antibiotik, penerapan kontrol pH, anti buih, serta beberapa indikator penting dalam sistem komputer. Mulai digunakan kultur medium dengan konsep recycle. Mulai banyak desain bioreaktor dalam proses.
7. Periode 1960-1979, mulai ramai penggunaan media hidrokarbon untuk produksi protein sel tunggal
8. Periode setelah 1979, digunakannya agen biologi sel unggul hasil manipulasi genetik melalui rekayasa genetika.



Gambar 5.1. Skema Fermentasi (Stanbury et al., 2003)

## 5.2. Komponen Proses Fermentasi

Proses fermentasi secara umum dibagi menjadi enam komponen utama (Stanbury et al., 2003):

- a. Formulasi media yang akan digunakan kultur organisme selama pengembangan inokulum dan produksi di bioraktor.

## ***Dasar-dasar Bioproses***

- b. Sterilisasi medium, fermentor, dan peralatan terkait
- c. Penyediaan kultur
- d. Pertumbuhan organisme dalam fermentor dalam keadaan optimum
- e. Separasi produk dari kontaminan dan impuritas
- f. Pemanfaatan atau pengolahan produk samping selama terjadinya produksi.

sedangkan dalam industri komersial, proses fermentasi membutuhkan beberapa peralatan yang harus tersedia sehingga diperoleh produk yang maksimal (Allan, 1997)

### **1. Laboratorium mikrobiologi**

laboratorium ini diperlukan untuk persiapan kultur, termasuk modifikasi DNA dari sel mikroba yang akan digunakan dalam proses fermentasi sehingga diperoleh strain yang unggul, mengurangi produk samping, mengurangi pembentukan surfaktan, dan sebagainya. Dalam ruang laboratorium biasanya terdapat peralatan gelas kaca, washing area, area preparasi media, ruang inokulum, ruang inkubator, kantor, dan sebagainya. Ruangan ini juga memiliki sterilitas yang sangat tinggi. Seperti contoh digunakannya lampu UV, humiditas udara yang dijaga rendah, dan material bangunan yang digunakan harus mudah dibersihkan.

### **2. Laboratorium analisis**

Fungsi dari laboratorium analisis adalah untuk menguji sampel produk, sampel bahan baku, air proses, hingga limbah yang keluar selama proses fermentasi.

### **3. Tempat penyimpanan**

Tempat penyimpanan harus berjauhan dengan tempat pabrik dan mudah dijangkau oleh transportasi. Kondisi operasi tempat penyimpanan baik bahan baku maupun produk harus diperhatikan sehingga kondisi materialnya tidak rusak.

### **4. Area preparasi media (batching area)**

Area preparasi media digunakan untuk mentreatment media yang akan digunakan sebelum masuk ke fermentor utama. Seperti contoh preparasi molases, hidrolisis pati dan protein, dan sebagainya.

5. Fermentor Pembibitan

Fermentor ini digunakan untuk menginokulasi mikroorganisme sebelum masuk ke fermentor utama sehingga diperoleh jumlah mikroorganisme yang diinginkan. Umumnya volume fermentor lebih kecil dari fermentor utama namun tidak dilengkapi dengan anti foam dan pipa nutrient.

6. Fermentor Utama

Fermentor utama merupakan bagian terpenting dalam industri fermentasi. Fermentor umumnya ditempatkan di luar ruangan, dengan suhu yang digunakan adalah suhu sekitar. Fermentor modern telah dilengkapi dengan sensor kontrol untuk mengetahui parameter apa saja yang perlu diubah untuk mendapatkan hasil maksimal.

7. Tangki Feed Nutrien

Tangki nutrien bisa bermacam macam sesuai kebutuhan proses seperti tangki untuk sumber karbohidrat, tangki untuk anti foaming, tangki untuk garam, tangki untuk pengaturan pH asam dan basa, dan tangki untuk trace element mukronutrien.

8. Filter Udara steril

Filter udara merupakan komponen penting dalam proses fermentasi mengingat udara di lingkungan banyak mengandung mikroorganisme. Beberapa perusahaan masih mendesain filter udara sendiri, sementara lainnya dapat memesan dari vendor. Filter udara umumnya didesain secara packed bed atau filter dengan menggunakan cartridge untuk mengurangi humiditas sehingga udara yang dihasilkan dalam keadaan kering.

9. Kompresor Udara

Kompresor udara yang digunakan dalam industri fermentasi adalah kompresor yang bebas dari oli dengan ukuran yang kecil. Untuk pabrik besar, biasa digunakan kompresor udara centrifugal.

10. Valve

Beberapa perusahaan menggunakan tipe valve tertentu, atau membuat paten sendiri, beberapa lainnya ada yang tidak menggunakan valve. Valve merupakan bagian penting dalam fermentasi untuk mengontrol laju alir. Namun valve

merupakan komponen yang paling mudah terinfeksi karena bentuk yang tidak flat. Selain itu valve merupakan komponen yang paling susah disterilisasi jika operasi fermentor dalam keadaan batch.

**11. Pompa**

Tipe pompa yang biasa digunakan dalam industri fermentasi adalah pompa peristaltik pada beberapa bagian yang diperlukan dengan sterilitas tinggi. Pompa peristaltik memungkinkan cairan dalam kondisi sterili karena tidak adanya tekanan balik, dan minimnya kontak antara material pompa dengan cairan. Sedangkan untuk material non steril dapat menggunakan pompa sentrifugal (316 S/S) seperti slurry, broth hasil pemanenan, dan sebagainya.

**12. Peralatan Pendingin / HE**

Unit ini digunakan untuk mendinginkan media setelah dilakukan sterilisasi, selain itu juga digunakan untuk menurunkan suhu selama terjadinya proses fermentasi eksotermis, untuk mendinginkan broth sebelum dilakukan pemanenan, dan mendinginkan air yang terkompresi.

**13. Kontrol Lingkungan**

Kontrol lingkungan lebih ditekankan untuk mengetahui pencemaran yang terjadi selama proses fermentasi. Beberapa polutan yang umum muncul selama proses adalah adanya bau, limbah cair, dan limbah padat.

**5.3. Proses Fermentasi**

Proses fermentasi dapat dibedakan menjadi beberapa klasifikasi. Klasifikasi umum untuk proses fermentasi adalah tipe batch, fed-batch, dan kontinyu. (Tabel 5.1)

Tabel 5.1. Pembagian proses fermentasi (Harada et al., 1997)	
1.	Proses batch
2.	Proses fed- batch
	- Proses fed batch berulang proses siklis
	- Proses fed batch semi kontinyu
3.	Proses kontinyu

Fermentasi batch adalah proses fermentasi paling tradisional. Untuk proses ini, fase sel dapat diamati mulai dari fase adaptasi hingga fase kematian, nutrisi dan produk berada dalam satu reaktor, serta pembentukan produk adalah fungsi waktu.

Fermentasi fed batch adalah operasi fermentasi dengan menggunakan nutrisi yang ditambahkan secara kontinyu atau berkesinambungan ke dalam medium sehingga volume pada reaktor akan semakin bertambah dari awalnya. Proses ini umumnya digunakan untuk menghindari terjadinya inhibisi substrat, efek glukosa, dan efek katabolisme.

Proses fermentasi secara kontinyu dapat dibedakan menjadi proses kontinyu dengan kontrol feedback atau tanpa feedback (Tabel 5.2.)

Tabel 5.2. Proses fermentasi kontinyu (Harada et al., 1997)	
1.	Tanpa kontrol feedback
a.	Chemostat
2.	Dengan kontrol feedback
a.	Turbidostat
b.	Nutristat
c.	Phauxostat

Pada operasi chemostat, medium yang mengandung nutrisi secara kontinyu dialirkan ke dalam reaktor dengan laju alir (laju pengenceran) konstan dan broth kultur secara sinambung dikeluarkan dari reaktor dengan laju yang sama. Proses ini cocok digunakan untuk optimisasi formulasi media dan menginvestigasi karakter fisiologis dari mikroorganisme.

Pada operasi turbidostat dilakukan kontrol feedback dengan proses kontinyu untuk mempertahankan konsentrasi sel pada level konstan dengan mengontrol laju alir feed medium. Untuk operasi nutristat, level konsentrasi nutrisi yang diset konstan. Sedangkan untuk operasi phauxostat adalah sama seperti operasi nutristat dengan menjaga level pH dari medium.

#### **5.4. Faktor Berpengaruh dalam Fermentasi**

Fermentasi dipengaruhi oleh banyak faktor, baik faktor eksternal maupun internal. Dalam Fermentasi komersial, faktor tersebut dapat diklasifikasikan dalam faktor kimia, fisika, dan biologis. Faktor-faktor tersebut sering dimonitor secara online maupun berkala untuk mengetahui gangguan yang ada.

- Faktor kimia

Beberapa faktor kimia yang mempengaruhi fermentasi di antaranya adalah pH selama proses fermentasi, konsentrasi gas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ), salinitas, konsentrasi produk metabolik, dan komposisi nutrisi dalam medium.

- Faktor fisika

Faktor fisika yang berpengaruh dalam fermentasi di antaranya adalah tekanan, suhu, turbiditas, laju alir gas, viskositas medium, kecepatan pengadukan, faktor gesekan dalam fermentor, buih, dan berat atau volume broth.

- Faktor biologis

Faktor biologis dalam proses fermentasi berkaitan dengan organisme yang digunakan selama proses seperti aktivitas enzim, komposisi sel, level ATP, dan kontaminan organisme lain.

#### **5.5. Kondisi Fermentasi berdasarkan Nutrien**

Nutrien dalam fermentasi skala komersial merupakan aspek penting yang perlu diperhatikan. Nutrien yang dibutuhkan mikroorganisme merupakan hal yang kompleks, tidak hanya spesifik untuk bakteri, yeast, mold, tapi juga mencakup strain dari mikroorganisme tersebut. Mikroorganisme membutuhkan energi untuk kelangsungan biosintesis dan pertumbuhannya dalam konsentrasi tertentu (Willem, 1997)

Dalam bioteknologi, dikenal beberapa tipe mikroorganisme yang dibedakan berdasarkan kebutuhan nutriennya. Umumnya mikroorganisme yang memanfaatkan cahaya sebagai sumber energi disebut mikroorganisme phototrof, sementara mikroorganisme yang memanfaatkan sumber energi kimia disebut kemotrof.

Seiring kemajuan bioteknologi, tipe organisme dapat dibedakan berdasarkan tipe sumber karbonnya. Organisme yang memanfaatkan CO<sub>2</sub> disebut sebagai autotrofik. Organisme yang menggunakan komponen karbon organik seperti asam asetat, gliserol, disebut heterotrofik. Sedangkan mikroorganisme yang memanfaatkan keduanya disebut dapat dikategorikan (i) photoautotrofik (ii) photoheterotrofik (iii) kemoautotrofik (iv) kemoheterotrof.

Organisme Photoautotrof memanfaatkan cahaya sebagai sumber energi dan CO<sub>2</sub> sebagai sumber karbon utama. Contoh organisme ini adalah tanaman tingkat tinggi, alga eukariotik, dan cyanobakteria (bakteri yang berfotosintesis).

Organisme Photoheterotrof juga bergantung pada cahaya sebagai sumber energi namun memanfaatkan karbon organik sebagai sumber karbon utama. Beberapa mikroalga dapat berperan menjadi photoheterotrof. Dalam beberapa literatur, organisme ini juga disebut sebagai organisme mixotrofik.

Organisme Kemoheterotrof bergantung pada zat kimia sebagai sumber energi dan memanfaatkan CO<sub>2</sub> sebagai sumber karbon. Penggunaan CO<sub>2</sub> sebagai sumber karbon utama ini selalu berkaitan dengan kemampuan organisme dalam memanfaatkan komponen anorganik sebagai sumber energi. Sebagai contoh bakteri yang biasa mengurai limbah, mereduksi komponen nitrogen (NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>), komponen sulfur (H<sub>2</sub>S, S, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), dan H<sub>2</sub> sebagai sumber energi teroksidasi.

Organisme Kemoheterotrof memanfaatkan komponen karbon organik sebagai sumber karbon, dan zat kimia sebagai sumber energi. Beberapa jenis fungi dan sebagian besar bakteri memiliki karakteristik ini. Dalam industri fermentasi komersial, sebagian besar ditemui karakteristik organisme kemoheterotrof.

## **5.6. Kebutuhan Nutrisi Sel**

Selain sumber energi dan karbon, organisme membutuhkan sumber material untuk keberlangsungan biosintesis pembentukan sel dan produksi senyawa penting seperti enzim, memaintain keberlangsungan proses produksi, dan untuk respirasi (Willem, 1997). Beberapa mikroorganisme memanfaatkan elemen dalam bentuk sederhana,

## ***Dasar-dasar Bioproses***

lainnya dalam keadaan kompleks. Nutrisi ini akan digunakan untuk menopang pembentukan empat komponen utama dalam sel yakni lipid, polisakarida, DNA RNA, dan protein. Ringkasan sumber nutrisi dan fungsinya dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Elemen nutrisi dan fungsinya untuk mikroorganisme (Willem, 1997)

<b>Elemen</b>	<b>Simbol</b>	<b>Atom</b>	<b>Fungsi Fisiologis</b>
Hidrogen	H	1	Pembentuk air dan sel organik
Karbon	C	6	Pembentuk sel organik
Nitrogen	N	7	Pembentuk protein, asam nukleat, dan koenzim
Oksigen	O	8	Pembentuk air dan material organik
Natrium	Na	11	Sumber kation utama ekstraseluler
Magnesium	Mg	12	Kofaktor inorganik untuk reaksi enzimatik, pembentuk ATP, dan penyearah dalam reaksi fotosintesis
Fosfor	P	15	Pembentuk fosfolipid, koenzim, dan asam nukleat
Sulfur	S	16	Pembentuk cysteine, cystine, methionin, dan protein dalam bentuk koenzim seperti CoA dan cocarboxylase
Klorin	Cl	17	Sumber anion intraseluler dan ekstraseluler
Kalium	K	19	Kofaktor untuk beberapa enzim
Kalsium	Ca	20	Kofaktor untuk beberapa enzim
Mangan	Mn	25	Kofaktor untuk enzim dalam bentuk proteinases
Besi	Fe	26	Pembentuk cytochrome dan protein, kofaktor enzim
Kobalt	Co	27	Pembentuk vitamin B12 dan merupakan derivat koenzim
Tembaga	Cu	29	Pembentuk anorganik pada enzim tertentu
Seng	Zn	30	Pembentuk anorganik pada enzim tertentu

### **5.6.1. Sumber Karbon**

Umumnya biomassa sel tersusun atas 50% karbon dalam berat kering. Hal ini menunjukkan bahwa karbon merupakan sumber penopang sel paling krusial. Karbon merupakan elemen yang dapat berperan sebagai sumber energi maupun sumber dalam pembentukan sel, tergantung karakteristik organisme tersebut.



Dalam fermentasi komersial, sumber karbon organik merupakan sumber nutrisi yang memiliki biaya paling tinggi. Karbohidrat merupakan sumber paling lengkap untuk organisme dalam pemenuhan karbon, oksigen, hidrogen, dan energi metabolik. Penggunaannya umumnya berkisar 0,2-25%. Untuk mengurangi biaya operasi, biasanya industri menggunakan molases sebagai sumber karbon. Selain molases, dapat juga digunakan gliserol, dan asam organik.

#### 5.6.2. Sumber Nitrogen dan Sulfur

Elemen terpenting setelah karbon adalah nitrogen dan sulfur. Nitrogen dan sulfur peran besar dalam metabolisme sel seperti pembentukan lipid dan protein. Sebagian besar organisme fotosintesis mengasimilasi sumber nitrogen dan sulfur dalam bentuk anorganik oksidatif seperti nitrat dan sulfat, namun beberapa bakteri nonfotosintesis juga dapat memanfaatkan sumber anorganik ini meski terkadang juga memanfaatkan dalam bentuk organik yang mudah direduksi seperti amino dan sulfhydryl. Sedangkan sebagian besar alga dan fungi memanfaatkan nitrogen dalam bentuk ammonium nitrat dan natrium nitrat. Hanya sedikit organisme yang dapat memanfaatkan nitrit sebagai sumber nitrogen.

Industri fermentasi umumnya memanfaatkan nitrogen organik kompleks untuk mengurangi biaya produksi. Bentuk nitrogen organik di antaranya adalah produk sisa dari agroindustri dan industri makanan seperti tulang ikan, gluten, protein pepton, dan hasil digestasi dari casein, yeast, susu, dan sebagainya.

#### 5.6.3. Sumber Elemen Trace dan Elemen esensial

Mineral secara umum menjadi elemen penting dalam kultivasi sel untuk menopang pertumbuhan. Fungsi biologis dari elemen dapat dilihat pada Tabel. Fosfor merupakan elemen esensial dalam pembentukan DNA, RNA, dan ATP. Sedangkan elemen lain seperti Mg, Na, K, merupakan elemen penting dalam produksi enzim.

Kebutuhan elemen trace dapat berupa besi, seng, mangan, molybdenum, kobalt, kalsium, dan copper. Fungsi dari setiap elemen trace tersebut berbeda beda, namun secara umum kebutuhannya dalam media adalah sangat sedikit. Elemen trace dapat

## ***Dasar-dasar Bioproses***

berkontribusi dalam produk utama maupun metabolik sekunder. Contoh seng dan besi berperan penting dalam produksi antibiotik.

### **5.6.4. Sumber Vitamin dan Faktor Lain**

Vitamin merupakan biokatalis yang berperan dalam biosintesis sel dan dibutuhkan dalam jumlah kecil, bahkan lebih sedikit dari elemen trace. Umumnya vitamin ditambahkan dalam bentuk organik yang berfungsi sebagai koenzim untuk menopang reaksi katalitik dalam sel. Tabel menyajikan beberapa fungsi vitamin beserta sumbernya.

Sumber vitamin yang paling dibutuhkan sel umumnya adalah thiamin dan biotin. Sedangkan vitamin yang dibutuhkan dalam jumlah yang lumayan banyak adalah niacin, panthotenate, dan ribloflavin. Sedangkan vitamin B12, folat, biotin, dan asam lipoic merupakan senyawa yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit.

## **BAB VI**

---

### **Desain Bioreaktor**

Bioreaktor merupakan komponen utama dalam komersialisasi produk bioproses. Kesalahan dalam mendesain bioreaktor akan berakibat fatal dalam hasil yang diperoleh. Umumnya desain bioreaktor diserahkan oleh insinyur teknik kimia yang terbiasa menangani desain unit operasi, hanya saja kondisi operasinya harus disesuaikan dengan kaidah bioproses seperti pemilihan material, neraca massa dan panas, pengadukan, transfer panas, fenomena perpindahan, dan sebagainya.

Ghasem (2007) menyatakan jika ingin mendesain bioreaktor, maka perlu dilakukan beberapa pertimbangan seperti:

- a. Konfigurasi reaktor :Apakah reaktor dalam bentuk berpengaduk? atau memiliki sparger? atau tanpa agitasi?
- b. Ukuran reaktor :Seberapa besar ukuran yang diperlukan agar memperoleh kecepatan reaksi sesuai harapan?
- c. Kondisi operasi :Seperti apa kondisi operasi saat terjadinya reaksi? bagaimana mengontrolnya? bagaimana kontaminan dapat dihilangkan?
- d. Mode operasi :Apakah operasi dalam keadaan batch? feed batch? kontinyu? apakah reaktor dalam keadaan seri?

Ghasem (2007) juga menyatakan bahwa terdapat tiga grup bioreaktor yang biasa ditemui dalam bidang industri bioproses:

- 1. Sistem tanpa aerasi dan tanpa pengadukan : terdapat sekitar 70%
- 2. Sistem aerasi, tanpa pengadukan : terdapat sekitar 10%
- 3. Sistem aerasi dan pengadukan : terdapat sekitar 30%

Vessel sistem aerasi tanpa pengadukan biasa digunakan dalam industri tradisional seperti industri keju, wine, dan beer. Sebagian besar teknologi bioproses modern saat ini membutuhkan pertumbuhan mikroba dalam kondisi aerasi dan pengadukan.

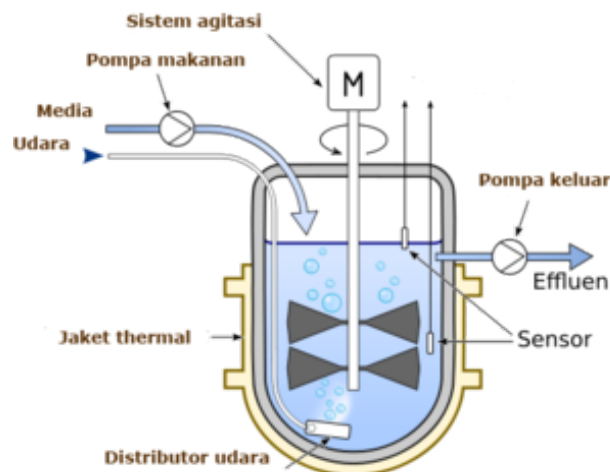
## **6.1. Tipe Bioreaktor**

Fungsi utama dari bioreaktor adalah menyediakan lingkungan yang dapat dikontrol untuk mendapatkan pertumbuhan optimal dan pembentukan produk sesuai keinginan. Secara umum, kata fermenter juga sering disebut sebagai pengganti bioreaktor, keduanya memiliki persamaan makna. Namun secara umum bioreaktor tidak selalu memiliki fungsi sebagai fermentor, tempat terjadinya fermentasi. Dalam industri mikroalga, bioreaktor sering digunakan sebagai tempat budidaya mikroalga, tanpa melalui proses fermentasi (Pauline, 1995).

### **6.1.1. Tangi Berpengaduk**

Tangki berpengaduk ini biasa digunakan untuk reaksi enzimatik, baik enzim bebas maupun terimobilisasi, untuk sel tersuspensi atau sel terimobilisasi. Lebih jauh lagi, tangki berpengaduk diperlukan perawatan lebih intens seperti sterilisasi, dan sebagainya.

Bioreaktor konvensional, dengan komponen pengaduk dan aerasi dapat dilihat pada Gambar 6.1. Agitasi mekanik dapat menghasilkan pengadukan dan dispersi gelembung, hal ini membutuhkan input energi per satuan unit. Baffle digunakan di dalam vessel berfungsi untuk mengurangi terjadinya vortek selama pengadukan. Beberapa jenis impeler seperti ukuran dan bentuk juga perlu diperhatikan sesuai dengan kondisi operasi. Pada fermentor dengan bentuk tinggi, diperlukan beberapa impeler untuk menopang pengadukan.



Gambar 6.1. Bioreaktor Konvensional

Umumnya hanya 70-80% volume cairan yang akan mengisi reaktor. Hal ini diperlukan untuk mengantisipasi terjadinya buih dan luapan akibat gelembung gas. Jika selama proses fermentasi terbentuk buih, maka dapat diinstal alat pemecah buih pada bagian atas reaktor. Atau juga dapat digunakan senyawa kimia anti foaming untuk memecah terjadinya buih. Umumnya metode mekanis lebih sering digunakan karena lebih aman, sedangkan senyawa antifoaming dapat bereaksi dengan medium sehingga mengurangi transfer oksigen dan berbahaya bagi organisme. Buih pada fermentasi umum terjadi karena adanya perbedaan osmosis antara sel dan medium.

Rasio antara panjang dan lebar pada reaktor dapat bervariasi. Sebagai contoh, ketika diperlukan reaktor dengan aerasi tinggi, maka rasio juga semakin meningkat, reaktor akan semakin panjang, karena diperlukan waktu kontak antara udara dan medium yang lebih lama. Ketebalan baffle pada umumnya berkisar  $T/10$  dan  $T/12$ , di mana  $T$  adalah diameter tangki. Rasio tinggi dan lebar vessel umumnya 2:1 dan 6:1, sedangkan diameter vessel terhadap baffle adalah  $10 < D_t/D_b < 12$ .

Diameter tangki,  $D_{\text{tank}}$ , umumnya kurang dari 3 meter, dengan empat baffle yang dipasang memiliki ketebalan 5-8 inchi. Pemasangan sparger gas selalu diletakkan di bagian bawah vessel dengan jarak  $D_i/2$  di bawah agitator, di mana  $D_i$  adalah diameter impeler. Power input untuk vessel fermentor biasanya lebih dari  $100\text{W}/\text{m}^3$ , dan kecepatan impeler lebih besar dari 1.5 m/s.

Untuk mengetahui dimensi vessel, umumnya digunakan froude number,  $Fr$ , dengan nilai lebih besar dari 0,1

$$Fr = \frac{N^2 D_i}{g} > 0.1 \dots \dots \dots (6.1.)$$

Tipe agitator yang sangat umum digunakan adalah tipe turbin empat pisau. Pada sistem dengan sensitivitas sel yang tinggi, dan terdapat padatan, maka dapat digunakan tipe agitator inclined blade. Spesifikasi jumlah agitator agar sesuai dengan kondisi operasi yakni jika tinggi cairan dua atau tiga kali dari diameter tangki, diperlukan lebih dari satu agitator, dengan jarak  $h$ , di mana  $h$  adalah setara dengan diameter tangki.

## ***Dasar-dasar Bioproses***

### 6.1.2. Bubble Column Reactor

Reaktor kolom bergelembung merupakan alternatif untuk reaktor berpengaduk tanpa menggunakan metode agitasi. Reaktor ini menggunakan prinsip penggelembungan (bubbling) untuk proses mixing dengan memakai semburan gas (gas sparging). Metode ini termasuk metode yang minim energi dibanding metode mekanik. Kolom gelembung banyak diaplikasikan di industri untuk produksi yeast bakery, beer, dan vinegar, dan untuk pengolahan limbah cair. Umumnya rasio tinggi terhadap lebar tangki adalah 3:1 untuk industri bakery. Sedangkan untuk aplikasi lain, umumnya digunakan dimensi rasio 6:1.

Kelebihan reaktor ini selain memiliki biaya operasi dan biaya instalasi yang rendah, juga mudah dipindahkan, memiliki transfer panas dan transfer massa yang sesuai keinginan. Kelemahan dari reaktor ini adalah mudah terbentuk foaming atau busa karena kontak gas yang terus menerus.

Komponen reaktor bubble termasuk sederhana. Pada Gambar 6.2., vessel berbentuk silinder dengan ketinggian dua kali dari diameter vessel. Sparger diinstal pada bagian bawah vessel untuk membentuk gelembung.

Hidrodinamika reaktor dan karakteristik transfer massa bergantung pada kelakuan gelembung yang terlepas dari sparger sepanjang reaktor. Pola aliran yang berbeda beda memungkinkan terjadi yang biasa dipengaruhi oleh kecepatan inlet gas, desain sparging, diameter kolom, dan karakteristik medium seperti kekentalannya, densitasnya, dan sebagainya. Aliran homogen terjadi hanya ketika kecepatan aliran gas dalam keadaan rendah. Pada aliran homogen, semua gelembung naik dengan kecepatan yang sama, tidak ada *back mixing* pada fase gas.

Lain halnya dengan kondisi aliran heterogen, pada pola ini, gelembung dan cairan cenderung naik ke bagian tengah kolom sementara pada bagian tepi kolom mengalami penurunan aliran sehingga terkadang terjadi backmixing.

Waktu yang diperlukan untuk mixing cairan dalam kolom bergantung pada regim aliran. Untuk pola heterogen, digunakan persamaan  $uL = 0.9(g D uG)^{0.33}$  dengan kondisi

$$0.1 < D < 7.5 \text{ m dan } 0 < uG, 0.4 \text{ m/s}$$

$uL$  adalah kecepatan linier cairan,  $g$  adalah percepatan gravitasi,  $D$  adalah diameter kolom, dan  $uG$  adalah kecepatan superfisi gas, yang memiliki nilai sama dengan kecepatan volumetrik gas pada tekanan atmosfer.

$$uG \text{ dapat dihitung dengan persamaan } uG = \frac{Q_{gas}}{A} \dots\dots\dots(6.3.)$$

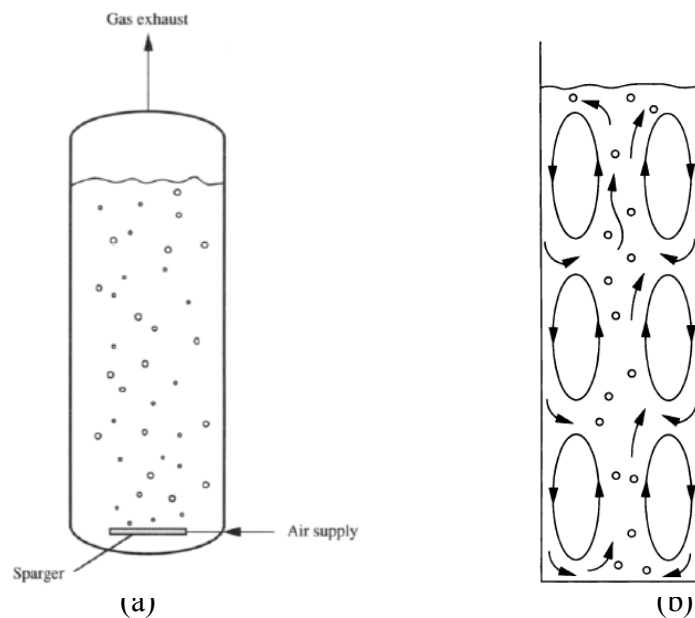
di mana  $Q_{gas}$  laju alir gas pada kolom,  $A$  adalah luas area yang dilalui gas

Dari persamaan ini diperoleh beberapa parameter sehingga nilai waktu  $t$  dapat dihitung dengan persamaan

$$t_{mixing} = 11 \frac{H}{D} (g uG D^{-2})^{-0.33} \dots\dots\dots(6.3.)$$

di mana  $H$  adalah tinggi kolom

Nilai dari transfer massa antara gas dan cairan bergantung pada diameter gelembung dan gas hold up.



Gambar 6.2. Vessel Reaktor Bergelembung (a) komponen (b) kondisi heterogen  
(Pauline, 1995)

## ***Dasar-dasar Bioproses***

Pada kolom yang memiliki viskositas rendah, terdapat beberapa variabel yang hanya bergantung pada kecepatan aliran gas. Namun terkadang susah dilakukan prediksi ukuran gelembung jika diaplikasikan dalam industri komersial. Korelasi transfer antara cairan dengan gelembung pada aliran heterogen dapat dinyatakan dengan

$$kLa \approx 0.32uG^{0.7}$$

di mana  $kLa$  adalah koefisien volumetrik yang dikombinasikan dengan transfer massa dan  $uG$  adalah kecepatan superfisial gas. Persamaan ini valid untuk gelembung dengan diameter kisaran 6 mm,  $0,08 \text{ m} < D < 11,6 \text{ m}$ ,  $0,3 < H < 21 \text{ m}$ , dan  $0 < uG < 0,3 \text{ m/s}$ . Jika gelembung dengan ukuran lebih kecil dihasilkan dari sparger, dan medium tidak mudah bergesekan dengan gas, maka  $kLa$  akan lebih besar dari nilai yang dihitung dengan persamaan di atas, terutama pada nilai yang rendah pada  $uG < 10^{-2} \text{ m/s}$ .

### **6.1.3. Reaktor Airlift**

Reaktor airlift sering digunakan untuk perbanyakan culture karena sel memiliki sensitivitas tinggi terhadap gesekan sehingga pengadukan secara normal tidak mungkin dilakukan. Pada reaktor ini, gas disemburkan pada bagian kolom riser sehingga cairan ikut terangkat dan turun pada bagian downcomer. Cairan bersirkulasi dalam reaktor airlift sebagai hasil dari perbedaan densitas antara bagian kolom riser dan downcomer.

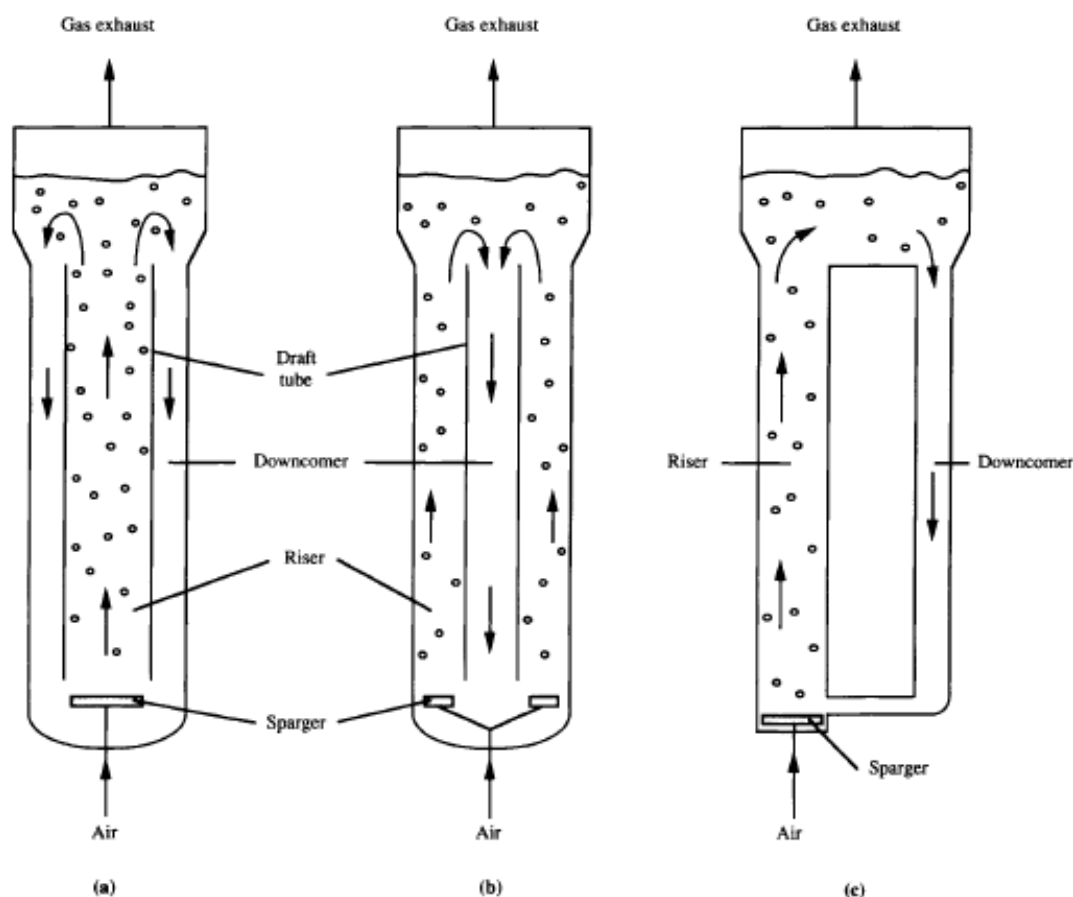
Terdapat banyak bentuk bioraktor airlift. Bentuk airlift secara umum adalah, udara diumpankan dari bagian bawah tube melalui ring sparger, sehingga mengurangi densitas cairan. Aliran naik melalui bagian atas reaktor, di mana bagian ini udara berlebih akan dilepas, termasuk gas by-product seperti  $\text{CO}_2$ . Aliran kemudian menuruni bagian luar tube. Hal ini dapat diperinci dengan bagian airlift yang memiliki bagian umum:

- Vessel internal loop
- Draft tube
- External loop atau loop terluar

Gambar 6.3. memperlihatkan konfigurasi airlift secara umum. Pada Gambar 6.3.a dan 6.3.b., riser dan downcomer dipisahkan oleh baffel atau draft tube, udara disemburkan pada draft tube atau anulus. Pada bagian external loop atau loop terluar



Gambar 6.3.c., tube vertikal yang terpisah memiliki bagian penghubung pada sesi atas dan bawah reaktor.



Gambar 6.3. Reaktor Airlift (Pauline, 1995)

Reaktor airlift umumnya memiliki pengadukan yang lebih baik dari kolom bubble. Konfigurasi airlift memiliki aliran yang lebih stabil, sehingga aliran gas yang lebih besar dapat digunakan tanpa mengalami hambatan seperti timbulnya pembentukan buih.

Koefisien transfer massa untuk external loop dapat diestimasi menggunakan persamaan

$$KLa < 0,32ug^{0,7}$$

Ketinggian reaktor airlift umumnya 10 kali dari diameter kolom ( $H=10D$ ).

Kelemahan reaktor airlift :

- Biaya operasi tinggi seiring semakin besarnya vessel

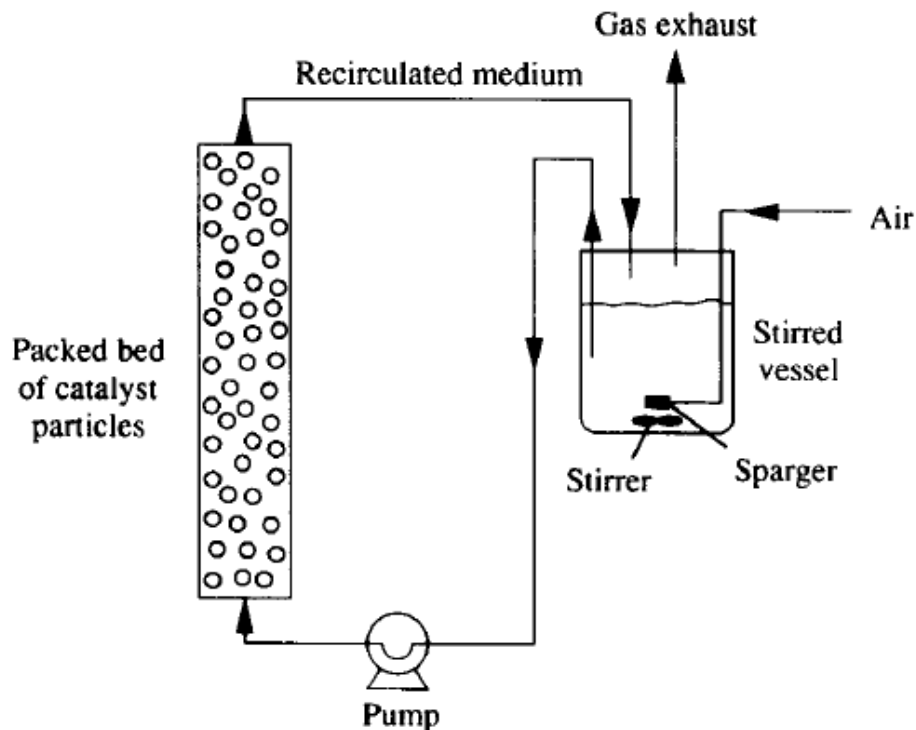
## ***Dasar-dasar Bioproses***

- Energi yang diperlukan cenderung tinggi. Meski tidak membutuhkan agitasi, udara yang diperlukan untuk airlift cenderung besar sehingga diperlukan tekanan lebih tinggi, termasuk pada skala yang lebih besar.
- Karena mikroorganisme mengalami sirkulasi, terjadi perubahan kondisi, sehingga sukar dilakukan kontrol nutrisi dan oksigen pada seluruh bagian vessel
- Separasi gas dari cairan tidak terlalu efisien jika terdapat buih.

Reaktor airlift umumnya diaplikasikan untuk produksi single sel protein dari methanol dan kultur sel, serta dalam industri pengolahan limbah cair.

### **6.1.4. Reaktor Packed Bed**

Reaktor packed bed dalam industri bioproses digunakan pada proses yang menggunakan biokatalis atau enzim yang terimobilisasi. Reaktor packed bed telah banyak digunakan untuk produksi aspartam dan fumarate, serta konversi penisilin menjadi 6-aminopenisillanik.

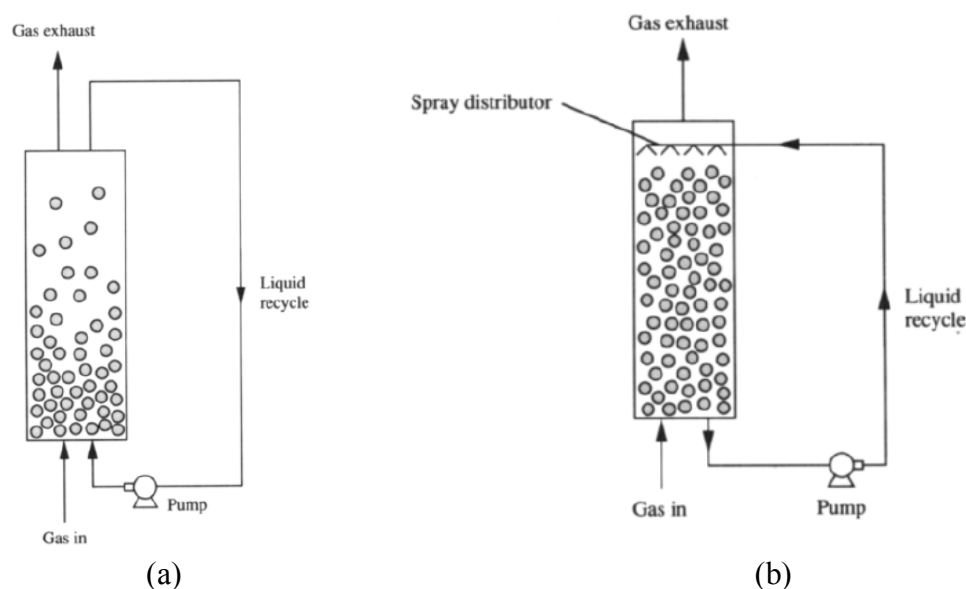


Gambar 6.4. Skema reaktor packed bed (Pauline, 1995)

Transfer massa antara medium cairan dan katalis solid terjadi antara cairan dengan bed pada kecepatan tinggi. Untuk menghasilkan yield yang tinggi, operasi dilakukan dengan merecycle medium melewati bed katalis (Gambar 6.4.). Pada reaktor ini, partikel bed harus memiliki sifat inkompresibel dan tidak mudah mengalami deformasi. Umumnya aerasi digunakan pada kolom yang terpisah dari kolom bed.

#### 6.1.5. Reaktor Unggun Fluidisasi

Reaktor unggun fluidisasi beroperasi hampir sama dengan reaktor packed bed. Hanya saja pada reaktor ini kolom medium cairan menyatu dengan kolom katalis. Reaktor ini lebih banyak digunakan untuk pengolahan limbah cair dengan menggunakan material pasir atau material lain yang mensupport populasi mikroba.



Gambar 6.5. Skema operasi reaktor unggun fluidisasi (a) tanpa spray (b) dengan spray (Pauline, 1995)

#### 6.1.6. Trickle Bed

Reaktor ini merupakan pengembangan dari reaktor packed bed. Pada reaktor ini, cairan diumpankan dari atas menggunakan spray dan cairan akan melewati bed dan gas dilewatkan dari bawah untuk menopang proses pertumbuhan bakteri. Reaktor ini umumnya digunakan untuk pengolahan limbah cair secara aerob.

## 6.2. Desain Reaktor untuk Sel

### 6.2.1. Desain Reaktor Batch

Secara umum, reaktor batch tidak memiliki pola aliran masuk dan keluar pada waktu yang ditetapkan, sehingga dimungkinkan dalam fasenya terdapat laju pertumbuhan dan laju kematian sel secara bersamaan pada rentang waktu tertentu.

Persamaan yang dapat mewakili kondisi tersebut adalah

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu XV - kd XV \dots\dots\dots (6.4.)$$

karena pada reaktor, V konstan, maka

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - kd)X \dots\dots\dots (6.5.)$$

dalam kultur batch, laju spesifik sel setara dengan laju spesifik maksimum sel. Jika kd (kontanta laju kematian sel) memiliki nilai konstan, maka dari penurunan rumus persamaan 6.5. didapatkan

$$X = X_o e^{(\mu_{max} - kd)t} \dots\dots\dots (6.6.)$$

Jika Xs adalah biomassa akhir setelah dilakukan kultur pada kondisi batch, maka persamaan 6.6. akan menghasilkan

$$t = \frac{1}{\mu_{max} - kd} \ln \frac{X_s}{X_o} \dots\dots\dots (6.7.)$$

Kecepatan kematian sel diabaikan, dengan asumsi  $kd \ll \mu_{max}$

Dalam kondisi batch, substrat merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap pembentukan biomassa, laju alir massa masuk dan keluar tidak ada,  $M_i = M_o = 0$ ,. Pada bab 4 kita telah mempelajari reaksi pengambilan substrat ( $r_s$ ). Jika produk terbentuk tapi tidak berhubungan langsung dengan metabolisme energi, maka

$$r_s V = \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + \frac{q_p}{Y_{PS}} + m_s \right) x V \dots\dots\dots (6.8)$$

Untuk reaksi yang lebih komplek, jika beberapa komponen diketahui seperti yield biomas dari substrat, ( $Y_s$ ), yield produk dari substrat ( $Y_{ps}$ ), koefisien maintenance reaktor ( $m_s$ ), dan laju spesifik pembentukan produk ( $q_p$ ), maka dapat dihitung waktu

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left[ 1 + \frac{C_{so} - C_s}{\left( \frac{1}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{\mu_{max} Y_{ps}} + \frac{m_s}{\mu_{max}} \right) X_o} \right] \dots\dots\dots (6.9.)$$

di mana  $X_o$  adalah biomassa awal

Persamaan 6.9. juga dapat disederhanakan lagi jika tidak ada produk yang terbentuk atau jika produksi berhubungan langsung dengan metabolisme energi.

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left[ 1 + \frac{C_{so} - C_s}{\left( \frac{1}{Y_{xs}} + \frac{m_s}{\mu_{max}} \right) X_0} \right] \dots\dots\dots (6.10.)$$

dan koefisiensi maintenance dapat diabaikan sehingga

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left[ 1 + \frac{Y_{xs}}{X_0} (C_{so} - C_s) \right] \dots\dots\dots (6.11)$$

Sedangkan jika ingin dihitung berdasarkan konsentrasi produk,  $p$ , maka persamaan 6.11. menjadi

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left[ 1 + \frac{\mu_{max}}{q_p X_0} (p_s - p_0) \right] \dots\dots\dots (6.12)$$

### 6.2.2. Desain Reaktor CSTR

Dalam mendesain bioreaktor, neraca massa digunakan untuk semua aliran yang berkaitan dengan vessel fermentasi. Biomassa pada aliran masuk, keluar, dan biomassa yang terakumulasi harus memiliki keseimbangan selama proses fermentasi. Neraca massa sel, tanpa akumulasi sel asing, dapat dijabarkan dengan persamaan

$$F(X_0 - X) + Vr = 0 \dots\dots\dots (6.13)$$

di mana  $X$  adalah sel pada aliran keluar dan  $X_0$  adalah sel pada aliran masuk.  $F$  adalah kecepatan aliran volumetrik,  $V$  adalah volume reaktor yang menampung medium, dan  $r_x$  adalah kecepatan pembentukan sel per unit volume. Persamaan kecepatan dapat dijelaskan secara detail menggunakan model persamaan monod. Model Monod umumnya digunakan pada kinetika pertumbuhan mikroba

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \dots\dots\dots (6.14)$$

di mana  $\mu$  adalah kecepatan spesifik,  $\mu_{max}$  adalah kecepatan maksimum spesifik,  $S$  adalah substrat, dan  $K_s$  adalah konstanta Monod.

Dalam hal ini, laju kematian sel tidak dimasukkan dalam persamaan. Pemodelan kembali persamaan 6.13. dengan notasi  $r_x/X$  adalah laju pertumbuhan spesifik  $\mu$ , sedangkan  $D$  adalah laju pengenceran, yakni volume cairan tangki yang lewat per unit waktu ( $F/V$ ), menghasilkan persamaan

$$DX_0 = (D - \mu)X \dots\dots\dots (6.15)$$

## Dasar-dasar Bioproses

substitusi persamaan 6.14. ke dalam persamaan 6.15. menghasilkan persamaan baru

$$\left(\frac{\mu_{max}S}{K_s+S} - D\right)X + DX_0 = 0 \dots\dots\dots(6.16)$$

Untuk media steril dengan nutrisi yang sesuai dan tanpa kontaminan, maka

$$X_0 = 0, \quad 0 = (D - \mu)X$$

Diasumsikan bahwa biomassa yang dihasilkan tidak boleh nol,  $X \neq 0$ , sehingga  $D - \mu = 0$

$$D = \mu$$

Pada kondisi steady state, pemanfaatan substrat adalah setimbang dengan kecepatan reaksi, oleh sebab itu

$$F(S_i - S) = \left(\frac{\mu_{max}S}{K_m+S}\right)V \dots\dots\dots(6.17)$$

Jika volume vessel dibagi dengan laju aliran, maka akan dihasilkan waktu retensi, yang berbanding terbalik dengan faktor pengenceran.

$$\frac{V}{F} = \tau = \frac{1}{D} \dots\dots\dots(6.18)$$

memasukkan persamaan 6.18. ke dalam persamaan 6.17. menghasilkan persamaan

$$D(S_i - S) = \frac{\mu_{max}S}{K_m+S} \dots\dots\dots(6.19)$$

atau dapat ditulis dengan persamaan

$$\frac{\mu_{max}S}{K_s+S} = D \text{ atau } S = \frac{DK_s}{\mu_{max}-D} \dots\dots\dots(6.20.)$$

untuk neraca massa yang menggunakan pengamatan densitas sel, dapat menggunakan

$$F_{Si} - F_s - \left(\frac{\mu}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{Y_{ps}} + m_s\right)xV = 0 \dots\dots\dots(6.21)$$

di mana  $x$  adalah biomassa didalam reaktor,  $Y_{xs}$  adalah yield biomassa dari substrat,  $Y_{ps}$  adalah yield produk dari substrat,  $q_p$  adalah laju pembentukan produk yang

berhubungan langsung dengan metabolisme energi (contoh produk etanol), dan  $m_s$  koefisien maintenance. (lihat bab 4).

Dengan substitusi persamaan 6.18 ke persamaan 6.21 untuk mengganti F dan V menjadi bentuk D, dan asumsi bahwa  $D=\mu$  kita dapat menyatakan persamaan

$$x = \frac{D(s_i - s)}{\frac{D}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{Y_{ps}} + m_s} \dots\dots\dots(6.22)$$

Persamaan 6.22. dapat disederhanakan menjadi

$$x = \frac{D(s_i - s)}{\frac{D}{Y_{xs}} + m_s} \dots\dots\dots(6.23)$$

untuk kasus spesial jika faktor maintenance diabaikan maka persamaan 6.23 menjadi

$$x = (s_i - s)Y_{xs} \dots\dots\dots(6.24)$$

substitusi persamaan 6.20 ke 6.24. menjadi

$$x = (S_i - \frac{DK_S}{\mu_{max} - D})Y_{xs} \dots\dots\dots (6.25)$$

Persamaan 6.25 berlaku untuk kondisi steril,  $X_0 = 0$ , dan tidak terbentuk produk samping. Selain itu persamaan 6.25 dapat digunakan untuk produk yang berkaitan atau tidak berkaitan langsung dengan metabolisme energi (lihat Bab 4)

Kita juga dapat memodifikasi neraca massa pada persamaan 6.13 menjadi

$$Fp_i - Fp + q_p x V = 0 \dots\dots\dots(6.26)$$

dimana  $q_p$  adalah laju pembentukan produk spesifik. Dengan substitusi persamaan 6.18 ke persamaan 6.26 menghasilkan

$$p = p_i + \frac{q_p x}{D} \dots\dots\dots(6.27)$$

x pada persamaan 6.27 dapat dievaluasi dengan persamaan 6.23., 6.24., atau 6.25., sesuai tipe metabolisme dan produk biomassa yang dihasilkan. Untuk kasus sederhana jika

## Dasar-dasar Bioproses

produk berhubungan dengan pembentukan energi serta efek maintenance dihiraukan, maka desain reaktor dapat menggunakan persamaan 6.20. dan 6.25.

Untuk kasus tertentu, jika faktor pengenceran mendekati nol, maka hampir semua substrat akan terkonsumsi pada kondisi steady state sehingga pada persamaan 6.2.4.,  $x \approx s_i \cdot Y_{XS}$  Seiring naiknya nilai laju pengenceran, level konsentrasi dari substrataakhir akan naik mendekati nilai D, dan D akan mendekati  $\mu_{max}$ . Hasil dari kecepatan pengenceran akan mempengaruhi densitas sel hingga akhirnya menjadi berkurang. Jika  $D = \mu_{max}$ ,  $X = 0$ . Fenomena ini disebut sebagai wash out.

Untuk sistem tanpa faktor maintenance faktor pengenceran kritis  $D_{crit}$  nilai x adalah dianggap nol, sehingga persamaan 6.25 menjadi

$$D_{crit} = \frac{\mu_{max} S_i}{K_s + S_i} \dots \dots \dots (6.28)$$

Untuk sebagian besar kultur sel,  $K_s \ll s_i$ , sehingga nilai  $D_{crit} \approx \mu_{max}$ . Sehingga untuk menghindari terjadinya *washout* sel dari reaktor, nilai D harus kurang dari  $D_{crit}$ .

Laju produksi biomass dalam reaktor CSTR adalah setara dengan laju sel meninggalkan reaktor,  $F_x$ . Sehingga produktivitas volumetrik setara dengan dengan  $F_x$  dibagi dengan V

$$Q_x = \frac{F_x}{V} = D_x \dots \dots \dots (6.29)$$

dimana  $Q_x$  adalah laju volumetrik produksi biomassa. Hal ini juga hampir sama dengan  $Q_p$ , laju volumetrik pembentukan produk

$$Q_p = \frac{F_p}{V} = D_p \dots \dots \dots (6.30)$$

Jika koefisien maintenance diabaikan dan pembentukan produk tidak menyangkut metabolisme energi, maka kita dapat mensubstitusikan persamaan 6.29 dan 6.25 untuk menyatakan nilai x

$$Q_x = D \left( s_i - \frac{K_s D}{\mu_{max} - D} \right) Y_{XS} \dots \dots \dots (6.31)$$

Nilai Dmax atau D kritis, dapat dihitung berdasarkan modifikasi persamaan 6.28.



$$D_{max} = \frac{\mu_{max} S_i}{K_s + S_i} = \mu_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_i}}\right) \dots \dots \dots (6.32)$$

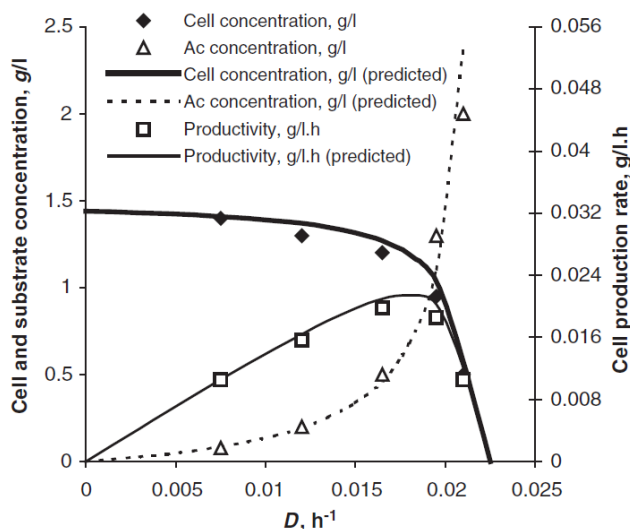
Saat operasi pada keadaan cenderung washout, reaktor akan sangat sensitif terhadap variasi laju pengenceran, D. Perubahan kecil dari D akan memberikan dampak pada X dan S. Laju produksi sel per unit volume dari reaktor adalah DX. Persamaan ini dapat dilihat pada Gambar 6.6. di mana terdapat perbedaan menonjol pada kurva DX. Kita dapat mengkomputasi kecepatan maksimal sel dengan membuat grafik DX terhadap D, dengan menyelesaikan persamaan

$$\frac{d(DX)}{dD} = 0 \dots \dots \dots (6.33)$$

$$\frac{d(XD)}{dD} = \frac{d}{dD} \left[ YD \left\{ S_0 - \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} \right\} \right] = 0 \dots \dots \dots (6.34)$$

setelah dilakukan diferensiasi persamaan 6.34, dihasilkan persamaan yang lebih sederhana untuk konsentrasi substrat awal terhadap laju pengenceran

$$S_i - \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} - \frac{DK_s \mu_{max}}{(\mu_{max} - D)^2} = 0 \dots \dots \dots (6.35)$$



Gambar 6.6. Grafik hubungan antara laju pengenceran, konsentrasi substrat dan laju produksi sel (Ghasem, 2007)

dengan mengubah persamaan 6.35 menjadi persamaan orde dua terhadap D, maka

$$\left(\frac{D}{\mu_{max}}\right)^2 (Si - Ks) + So - 2 \left(\frac{D}{\mu_{max}}\right) (Si - Ks) = 0 \dots\dots\dots(6.36)$$

dengan penyelesaian akar kuadar akan menghasilkan akar-akar

$$\frac{D}{\mu_{max}} = \frac{So-Ks}{2(So+Ks)} \pm \frac{\sqrt{(So-Ks)^2 - 4So(So+Ks)}}{2(So+Ks)} = 1 \pm \sqrt{1 - \frac{So}{So+Ks}}$$

$$\frac{D}{\mu_{max}} = 1 - \sqrt{\frac{Ks}{Ks+So}} \dots\dots\dots(6.37)$$

### 6.3. Desain Reaktor untuk Enzim

#### 6.3.1. Reaktor Batch untuk Enzim

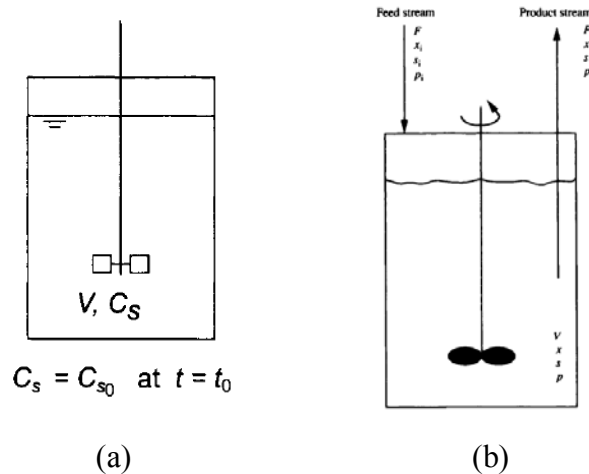
Reaktor batch untuk enzim umumnya menggunakan pengaduk, dan kontroler pH. Untuk mendesain reaktor, dapat menggunakan pendekatan persamaan Michaelis Menten

$$-\frac{dCs}{dt} = \frac{r_{max}Cs}{kM+Cs} \dots\dots\dots(6.38)$$

persamaan tersebut menyatakan perubahan konsentrasi substrat seiring perubahan waktu, dengan pengintegrasikannya akan diperoleh

$$\int_{C_{So}}^{C_s} -\left(\frac{K_M+Cs}{Cs}\right) dCs = \int_0^t r_{max} dt \dots\dots\dots(6.39)$$

$$Km \ln \frac{C_{So}}{C_s} + (C_{So} - C_s) = r_{max} t \dots\dots\dots(6.40)$$



Gambar 6.7. Komponen dimensi dalam reaktor (a) batch (b) CSTR (Dutta, 2008)

Persamaan tersebut menyatakan bagaimana  $C_s$  berubah terhadap waktu. Jika data  $r_{\max}$  dan  $K_m$  diketahui, maka perubahan  $C_s$  terhadap waktu dapat kita estimasi.

Persamaan tersebut juga dapat digunakan untuk reaktor steady state plug flow. Namun waktu  $t$  pada persamaan harus diganti dengan dengan waktu tinggal  $t$  pada plug flow, seperti pada Gambar 6.6. Modifikasi persamaan menghasilkan persamaan linier yang dapat digambarkan secara diagram linier.

$$\frac{C_{so}-C_s}{\ln(C_{so}-C_s)} = -K_m + \frac{r_{\max}t}{\ln\left(\frac{C_{so}}{C_s}\right)} \dots\dots\dots(6.41)$$

plot antara data  $\frac{C_{so}-C_s}{\ln(C_{so}-C_s)}$  terhadap  $t/\ln C_{so}/C_s$  akan menghasilkan garis lurus dengan slope  $r_{\max}$  dan intersep  $-K_m$

Untuk mengetahui waktu reaksi selama operasi, persamaan di atas dapat disederhanakan menjadi

$$t = \frac{K_m}{r_{\max}} \ln \frac{C_{so}}{C_s} + \frac{C_{so}-C_s}{r_{\max}} \dots\dots\dots(6.42)$$

Pada bab sebelumnya telah dibahas mengenai deaktivasi enzim. Dalam reaktor, kecepatan reaksi enzimatis,  $r_{\max}$ , akan menurun seiring deaktivasi enzim, sehingga

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{r_{\max,0}e^{-k_d t}}{K_m+C_s} \dots\dots\dots(6.43)$$

di mana  $r_{\max,0}$  adalah nilai  $r_{\max}$  sebelum terjadi deaktivasi dan  $k_d$  adalah konstanta deaktivasi orde satu. Penyederhanaan persamaan tersebut menghasilkan persamaan

$$t_b = -\frac{1}{k_d} \ln \left[ 1 - k_d \left( \frac{K_m}{r_{\max,0}} \ln \frac{C_{so}}{C_s} + \frac{C_{so}-C_s}{r_{\max,0}} \right) \right] \dots\dots\dots(6.44)$$

di mana  $t_b$  adalah waktu yang dibutuhkan pada reaksi batch.

Sedangkan untuk reaksi dengan enzim terimobilisasi, persamaan di atas dapat dimodifikasi dengan menggunakan efek transfer massa

$$\frac{dC_s}{dt} = -n \frac{r_{\max,Cs}}{K_m+C_s} \dots\dots\dots(6.45)$$

## Dasar-dasar Bioproses

di mana  $n$  adalah faktor efektivitas transfer massa.  $C_s$  adalah konsentrasi substrat bulk.

### 6.3.2. CSTR

Reaktor CSTR adalah reaktor ideal yang dibuat berdasarkan asumsi bahwa isi reaktor dapat diaduk secara sempurna dengan laju input dan output adalah sama (Gambar 6.6.b). Maka dari itu, konsentrasi beberapa komponen yang keluar dari reaktor diasumsikan sama seperti komponen yang ada di dalam reaktor. Operasi kontinyu dari enzim dapat meningkatkan produktivitas reaktor secara signifikan dengan mengeliminasi downtime.

Neraca substrat untuk reaktor CSTR dapat dinyatakan dengan

input – output + produk = akumulasi

$$FC_{so} - FC_s + r_s V = \frac{V dC_s}{dt} \dots \dots \dots (6.46)$$

di mana  $F$  adalah laju alir,  $V$  adalah volume reaktor. Dalam hal ini,  $r_s$  adalah kecepatan konsumsi substrat untuk reaksi enzimatik, sementara  $dC_s / dt$  adalah perubahan konsentrasi substrat dalam reaktor. Sesuai persamaan di atas  $r_s$  adalah setara dengan  $dC_s/dt$  jika  $F$  dalam nilai nol, hal ini berlaku pada operasi batch.

Karena reaktor CSTR memiliki konsentrasi yang konstan, maka  $dC_s / dt$  adalah nol. Jika pada persamaan Michaelis Menten dapat menghitung nilai kecepatan substrat ( $r_s$ ), maka substitusi persamaan Michaelis Menten dalam neraca persamaan CSTR menghasilkan

$$\frac{F}{V} = D = \frac{1}{\tau} = \frac{r_{max} C_s}{(C_{so} - C_s) (K_M + C_s)} \dots \dots \dots (6.47)$$

Parameter kinetik Michaelis Menten dapat diestimasi dengan melakukan eksperimen laboratorium dengan berbagai laju alir untuk mendapatkan data plot antara  $C_s$  terhadap  $(C_s \tau) / (C_{so} - C_s)$ . Pendekatan lain yang dapat digunakan adalah plot Langmuir ( $C_{sr}$  vs  $C_s$ ), setelah dilakukan perhitungan kecepatan reaksi pada berbagai laju alir.

Secara umum laju reaksi dapat dihitung dengan persamaan  $r = F (C_{so} - C_s) / V$ . Namun pendekatan Michaelis Menten dan beberapa metode lain dinilai merupakan penekatan yang paling akurat untuk reaksi enzimatik.

Jika enzim yang digunakan dalam bentuk imobilisasi, maka persamaan di atas perlu dimodifikasi sesuai koefisien massa transfer matriknya, sehingga

$$D = \frac{n r_{max} C_s}{(C_{so} - C_s)(KM + C_s)} \dots\dots\dots(6.48)$$

di mana  $n$  adalah faktor keefektivan koefisien transfer massa.

#### **6.4. Contoh Problem**

Beberapa contoh problem yang diambil dari handbook Bioprocess engineering principles (Pauline, 1995)

##### **1. Sel dalam Reaktor Batch**

Mikroba *Zymomonas mobilis* digunakan untuk mengkonversi glukosa menjadi etanol pada bioreaktor batch dalam keadaan anaerob. Yield biomass dari substrat adalah 0,06 gr/gr, sedangkan yield produk dari substrat adalah 7,7 gr/gr. Reaktor dimaintenance dengan koefisien 2,2gr/gr/jam. Diketahui dari eksperimen bahwa laju spesifik pembentukan produk selama maintenance adalah 1,1/ jam. Mikroba tersebut memiliki laju pertumbuhan spesifik 0,3 / jam. Diketahui pada reaktor, 5 gr bakteri diinokulasi pada 50 liter, mengandung 12 gr/ l glukosa. Dalam hal ini konstanta kematian sel diabaikan. Tentukan waktu yang diperlukan untuk

- a. memproduksi 10gr biomassa
- b. mendapatkan konversi substrat 90%
- c. memproduksi 100gr etanol.

Jawab

$Y_{xs} = 0,06$  gr/gr,  $Y_{px} = 7,7$  gr/gr,  $\mu_{max} = 0,3$ /jam,  $m_s = 2,2$  gr/gr/jam,  $m_p = 1,1$ / jam,

$x_o = 5g/50 l = 0,1gr/l$ ;  $X_o = 12gr/l$

## Dasar-dasar Bioproses

- a. Jika 10 gr biomassa diproduksi dari reaktor, maka jumlah akhir dari biomassa yang ada di reaktor adalah  $10+5 = 15$  gr/ Maka  $X_s = 15\text{gr}/50 \text{ l} = 0,3$  gr/l. Dari persamaan yang ada maka waktu yang diperlukan adalah

$$tb = \frac{1}{0,3} \ln \frac{0,3}{0,1} = 3,7 \text{ jam}$$

- b. Jika 90% substrat terkonversi,  $S_c = 0,1$   $S_{co} = 1,2$  gr/l. Sintesa etanol berhubungan langsung dengan metabolisme energi di dalam sel (lihat bab 5), sehingga

$$tb = \frac{1}{0,3} \ln \left[ 1 + \frac{(12 - 1,2)}{\left(\frac{1}{0,06} + \frac{2,2}{0,3}\right) \cdot 0,1} \right] = 5,7 \text{ jam}$$

- c.  $q_p$  dapat dihitung menggunakan persamaan  $q_p = Y_{px} \mu + m_p$   
pada kultur batch,  $\mu = \mu_{\max}$

$$q_p = 7,7 \text{ g/g} (0,3 / \text{jam}) + 1,1 / \text{jam} = 3,4 / \text{jam}$$

Karena tidak ada produk di awal pertumbuhan sel, maka  $p_o = 0$ . Produksi 100gr etanol adalah  $100\text{gr}/50 \text{ l} = 2\text{gr}/ \text{l}$ , sehingga  $p_t = 2\text{gr}/\text{l}$ . Untuk menghitung waktu berdasarkan produk, maka digunakan persamaan

$$tb = \frac{1}{0,3} \ln \left[ 1 + \frac{0,3}{(0,1)(3,4)} (2) \right] = 3,4 \text{ jam}$$

## 2. Imobilisasi Enzim dalam Reaktor CSTR

Enzim diimobilisasi dalam bead berbentuk bola dengan ketebalan 2mm untuk mengkonversi tyrosine menjadi DOPA dalam reaktor CSTR. Konstanta Michaelis-Menten untuk enzim terimobilisasi adalah  $2 \text{ gmol}/\text{m}^3$ . Cairan mengandung  $15\text{gmol}/\text{m}^3$  tyrosine diinjeksi ke dalam reaktor. Konversi yang diinginkan adalah 99%. laju reaksi enzimatis  $r_{\max}$  untuk enzim terimobilisasi sesuai eksperimen adalah  $1,5 \times 10^{-2} \text{ gmol}/\text{s} / \text{m}^3 \text{ bead}$ . Difusivitas efektif tyrosin ke dalam bead adalah  $7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ . Transfer massa external untuk sistem ini diabaikan. Tentukan volume reaktor untuk mentreatment  $18 \text{ m}^3 / \text{hari}$ .

Jawab

$$KM = 2 \text{ gmol}/\text{m}^3, r_{\max} = 1,5 \times 10^{-2} \text{ gmol}/\text{s}/\text{m}^3. \text{ Jari-jari (r) bead} = 2\text{mm}/2 = 10^{-3} \text{ m}, \theta = 7 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}. C_{so} = 15\text{gmol}/\text{m}^3$$

Konversi flowrate feed  $18 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$  menjadi  $2,08 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$

Untuk konversi 99%, maka substrat  $C_s (0,01 C_{so}) = 0,15 \text{ gmol/ m}^{-3}$ . Karena  $C_s \ll K_m$ , kita dapat mengasumsikan kinetika orde satu, dengan

$$k_1 = r_{\max} / K_M = 7,5 \times 10^{-3} / \text{s}.$$

Modulus Thiele untuk matrix berbentuk bola adalah

$$\theta = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k_1}{D_s}} = \frac{10^{-3}}{3} \sqrt{\frac{7,5 \times 10^{-3}}{7 \times 10^{-10}}} = 1,09$$

Dari grafik plot antara efektivitas dengan koefisien modulus Thiele (lihat Bab 3), diperoleh hasil efektifitas  $n = 0,64$ .

Kemudian kita lakukan perhitungan laju pengenceran untuk proses tersebut

$$D = \frac{n \cdot r_{\max} C_s}{(C_{so} - C_s)(K_M + C_s)}$$

$$D = \frac{0,64(1,5 \times 10^{-2})(0,15)}{(15 - 0,15)(2 + 0,15)}$$

$$D = 4,5 \times 10^{-5}$$

Dari persamaan dinyatakan bahwa  $\frac{1}{D} = \frac{V}{F}$

$$\text{sehingga } \frac{1}{4,5 \times 10^{-5}} = \frac{V}{2,08 \times 10^{-4}}$$

$$V = 4,6 \text{ m}^3$$

### **3. Konsentrasi sel kondisi steady state CSTR**

Sel *Zymomonas mobilis* pada contoh 1 digunakan pada kultur CSTR  $60 \text{ m}^3$ . Feed mengandung  $12 \text{ g/l}$  glukosa,  $K_s$  untuk organisme adalah  $0,2 \text{ g/l}$ .

- Berapa laju alir ( $F$ ) yang diperlukan untuk kondisi steady state substrat  $1,5 \text{ g/l}$  ?
- Berapakah densitas sel dari flow rate point a ?
- Pada flow rate point a, berapakah etanol yang dapat diproduksi?

## Dasar-dasar Bioproses

Jawab

$Y_{xs} = 0,06 \text{ g/g}$ ,  $Y_{px} = 7,7 \text{ g/g}$ ,  $\mu_{max} = 0,3 \text{ /jam}$ ,  $K_s = 0,2 \text{ g/l}$ ,  $m_s = 2,2 \text{ g/g/jam}$ ,  $S_i = 12 \text{ g/l}$ ,

$V = 60 \text{ m}^3$ . Dari contoh 1, nilai  $q_p = 3,4 \text{ /jam}$ .

Nilai  $Y_{ps}$  dapat dihitung dengan persamaan  $Y_{ps} = Y_{px} \cdot Y_{sx} = 0,46 \text{ g/g}$ .

- a.  $s = 1,5 \text{ g/l}$ , dari persamaan 6.20.

$$D = \frac{\mu_{max} s}{K_s + s} = \frac{(0,3)(1,5)}{(0,2) + (1,5)} = 0,26 \text{ /jam}$$

dari definisi laju pengenceran, dan hubungannya dengan volume (persamaan 6.18), dapat diperoleh nilai  $F = DV = (0,26)(60) = 15,6 \text{ m}^3 \text{ /jam}$

- b. Untuk produk etanol, maka sistem berkaitan dengan metabolisme energi maka untuk nilai  $x$  digunakan persamaan 6.23.

$$x = \frac{D(S_i - s)}{\frac{D}{Y_{xs}} + m_s}$$
$$x = \frac{(0,26)(12 - 1,5)}{\frac{(0,26)}{(0,06)} + 2,2} = 0,42 \text{ gr/l}$$

- c. Diasumsikan bahwa etanol tidak ada pada laju input,  $p_i = 0$ , maka konsentrasi produk yang terbentuk dapat dihitung sesuai persamaan 6.27

$$p = \frac{(3,4)(0,42)}{0,26} = 5,5 \text{ g/l}$$

### 4. Konversi Substrat dan Produktivitas biomassa reaktor CSTR

Fermentor dengan volume  $5 \text{ m}^3$  dioperasikan secara kontinyu dengan konsentrasi feed  $20 \text{ kg/m}^3$ . Mikroorganisme dikultivasi di dalam reaktor memiliki karakteristik  $\mu_{max} = 0,45 \text{ /jam}$ ,  $K_s = 0,8 \text{ kg/m}^3$ ,  $Y_{xs} = 0,55 \text{ kg/kg}$ .

- a. Berapa laju alir feed ( $F_i$ ) yang dibutuhkan agar diperoleh konversi substrat sampai 90% ?
- b. Berapakah produktivitas biomassa maksimum yang mungkin diperoleh?

Jawab

- a. Untuk konversi substrat 90%, maka nilai  $s = 0,1 \text{ s}_i$ . Dari persamaan 6.20



$$D = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} = \frac{(0,45)(2)}{(0,8) + (2)} = 0,32 \text{ jam}$$

dari definisi laju pengenceran, dan hubungannya dengan volume (persamaan 6.18), dapat diperoleh nilai  $F = DV = (0,32) (5) = 1,6 \text{ m}^3/\text{jam}$

- b. Diasumsikan bahwa koefisien maintenance dan pembentukan produk diabaikan, dari persamaan 6.31.

$$Q_x = (0,32) \left( 20 - \left( \frac{(0,8)(0,32)}{(0,45)(0,32)} \right) \right) 0,55$$

$$= 3,17 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{jam}$$

Produktivitas biomassa maksimum terjadi pada kondisi D maksimum (Dkritis), yang dapat dihitung dari persamaan 6.32.

$$D_{max} = \mu_{max} \left( 1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_i}} \right)$$

$$= 0,45 \left( 1 - \sqrt{\frac{0,8}{0,8 + 20}} \right) = 0,36 / \text{jam}$$

Sehingga nilai Qmax dapat dihitung berdasarkan nilai Dmax

$$Q_x = (0,36) \left( 20 - \left( \frac{(0,8)(0,36)}{(0,45)(0,36)} \right) \right) 0,55$$

$$= 3,33 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{jam}$$

### **6.5. Scale up Bioreaktor**

Scale up bioreaktor merupakan hal penting dalam komersialisasi produk. Bisa jadi sering terjadi kegagalan akibat scale up akibat dari kesalahan perhitungan dan desain. Beberapa parameter perlu dipertimbangkan seperti:

- Power per unit volume; agitasi dan mixing
- laju volumetrik aliran dari gas per unit volume pada reaktor
- laju gesekan maksimum
- laju transfer oksigen
- laju pemompaan per unit volume, N
- transfer panas, nilai reynold, dan area permukaan vessel

### ***Dasar-dasar Bioproses***

Beberapa parameter penting dalam scale up bioreaktor di antaranya dapat dilihat pada Tabel 6.1.

Tabel 6.1. Parameter scale up bioreaktor (Ghasem, 2007)

Parameter	Pilot	Konstanta	Skala plant	125000 L	Konstanta
	100 L	P/volume	$ND_1^2$	$ND_1$	Nre
Power, P(hp)	1	15,63	7800	6,25	0,005
P/volume	1	1	6,25	0,005	$4 \times 10^{-6}$
N, waktu mixing	1	0,48	1	0,005	$2 \times 10^{-3}$
Di, m	1	2,5	2,5	2,50	2,5
Laju agitasi	1	7,5	15,63	6,25	2,5
Ndi	1	1,2	2,5	1	0,4
Bil. Reynold	1	3	6,25	2,5	1
Bil. Froud	1	0,6	2,5	1	0,0003

## **BAB VII**

---

### **Aplikasi Fermentasi pada Makanan**

Fermentasi untuk makanan memiliki sejarah yang unik, berkaitan dengan daerah, adat istiadat, dan kondisi suatu bangsa. Sejarah awal fermentasi diyakini berasal dari kebudayaan lembah Indus, timur tengah, dan Mesir kuno. Fermentasi menjadi sangat terkenal di masa dahulu karena dapat merubah rasa, aroma, bentuk, dan sensor kecap lainnya dengan sensasi yang berbeda dan disukai banyak orang.

#### **7.1. Manfaat Makanan Fermentasi**

Beberapa alasan utama kenapa makanan yang diolah dengan proses fermentasi menjadi penting adalah:

- Meningkatkan daya cerna makanan  
Makanan yang terfermentasi umumnya lebih mudah dicerna tubuh. Sebagai contoh seorang yang susah mencerna susu akan mudah mengonsumsi yoghurt. Hal ini disebabkan karena gula yang ada di dalam susu telah dipecah menjadi gula sederhana. Daging yang telah diolah dengan enzim akan lebih empuk, dan banyak contoh lain.
- Kaya akan vitamin sehingga makanan lebih menyehatkan  
Mikroorganisme yang tumbuh selama fermentasi akan mensekresi beberapa senyawa minor seperti ribloflavin, biotin, dan vitamin B. Beberapa senyawa tersebut bermanfaat bagi kesehatan
- Menambah bakteri baik pada tubuh  
Beberapa makanan terfermentasi mengandung bakteri yang bermanfaat bagi kesehatan kita, atau biasa kita sebut makanan prebiotik. Salah satu jenis produk fermentasi yang paling populer adalah yoghurt yang mengandung bakteri baik bagi fungsi usus.
- Umumnya makanan terfermentasi memiliki masa simpan lebih lama

## ***Dasar-dasar Bioproses***

Produk susu akan lebih cepat basi dibanding produk yoghurt atau keju. Juga produk sayuran seperti kimchi, sauerkraut, dan salsa akan lebih lama masa simpannya.

- Makanan yang terfermentasi memiliki rasa, aroma, dan tekstur yang lebih baik

Dari hasil metabolik, mikroorganisme mengeluarkan senyawa tertentu yang dapat merubah cita rasa, aroma, dan tekstur dari produk fermentasi menjadi lebih baik, terutama pada produk sayuran dan daging.

Perkembangan industri makananan fermentasi tidak berjalan dengan instan. Secara singkat sejarah fermentasi makanan dapat dilihat pada Tabel 7.1.

Tabel 7.1. Sejarah industri makanan fermentasi (Jashbhani et al., 2008)

<b>Tahun</b>	<b>Perkembangan</b>
10000 SM - Abad pertengahan sebelum Masehi	Evolusi fermentasi dari penyimpanan makanan umumnya produk pertanian
7000 SM	Pembuatan keju dan roti
6000 SM	Pembuatan wine di Eropa Timur
5000 SM	Produk fermentasi susu dan minuman beralkohol
3500 SM	Pembuatan roti di Mesir
1500 SM	Preparasi saus untuk daging oleh Babilon
2000 SM – 1200	Perkembangan metode fermentasi susu
500 -1000	Perkembangan produk sereal dari fermentasi makanan
1881	Publikasi literatur mengenai brewing koji dan sake
1900-1930	Aplikasi mikrobiologi untuk fermentasi
1970- sekarang	Perkembangan produk fermentasi pangan

Beberapa contoh produk pangan dari proses fermentasi akan dijelaskan pada bab ini, termasuk proses produksi dan faktor terkait.

## 7.2. Keju

Keju merupakan produk fermentasi yang paling umum dijumpai di kehidupan sehari-hari dan merupakan produk fermentasi pangan terkuno yang diciptakan dalam sejarah kehidupan manusia. Diyakini bahwa keju berasal dari area Assyria sekitar 7000-8000 tahun yang lalu. Keju dibuat dengan bantuan *rennet*, semacam enzim yang dapat memisahkan zat padat dalam susu dan menggumpalkannya melalui beberapa proses.

Keju merupakan produk penting dalam industri makanan. Produksi keju dunia mencapai peningkatan 10% dari tahun 1997 sampai 2004 hingga  $17,8 \times 10^6$  ton. Eropa merupakan produsen keju terbesar di dunia, diikuti oleh Amerika utara (Knut et al., 2008)

Keju diproduksi dari susu yang difermentasi dengan dua metode:

- a. Teknik konsentrasi kasein susu dan lemak melalui koagulasi kasein oleh enzim proteolitik atau asam laktat
- b. Teknik drainase whey setelah penghancuran mekanik dari koagulas kasein

dua metode dasar tersebut yang mendasari ratusan variasi produk keju. Perbedaan produk keju yang umum dijumpai berasal dari perbedaan bibit (starter) kultur, penambahan kultur, kondisi fermentasi, pengurangan kadar whey, penggaraman, penambahan rasa, komposisi susu, kadar lemak dalam susu, dan banyak faktor lain. Beberapa contoh produk varietas keju dapat dilihat pada Tabel 7.2.

Tabel 7.2. Contoh produk keju dan tahun penemuan (Knut et al., 2008)

Produk	Tahun	Produk	Tahun	Produk	Tahun
Gorgonzola	897	Cheddar	1500	Stilton	1785
Roquefort	1070	Parmesan	1579	Camembert	1791
Grana	1200	Gouda	1697	St. Paulin	1816

**7.2.1. Jenis Keju**

Jenis keju dalam industri umumnya digolongkan menjadi 3, yakni:

**a. Keju keras**

Karakteristik keju ini memiliki lemak 35-55%, kandungan moisture 25-36%. Keju keras umumnya diolah dengan atau tanpa fermentasi asam propionat. Proses fermentasi pada tahap acidifikasi dan koagulasi rennet terjadi pada kondisi 33-38°C, selama 12-30 menit. Pemanasan selama mixing vat (52-55 °C). Bahan baku susu yang digunakan terkadang tanpa sterilisasi. Proses pematangan (ripening) membutuhkan waktu 6 minggu sampai 12 bulan. Keju iris tanpa lubang contoh: Gouda, Edamen, dan American Cheese. Sedangkan keju iris sangat keras dengan lubang contoh Parmesan, dan Emmentaler.

**b. Keju semi keras**

Keju ini memiliki kadar air 36-40%. dan kandungan lemak 30-55%. Kondisi operasi selama acidifikasi dan koagulasi rennet terjadi pada suhu 32-37°C selama 30-60 menit. Penggaraman menggunakan konsentrasi 1,5-2% NaCl. Proses ripening selama 12-60 hari atau 6-12 bulan.

**c. keju lembut**

Keju ini memiliki kadar air 40% - 60% dengan kandungan lemak 25-60% dan diproduksi dengan susu yang telah dipasteurisasi. Waktu ripening cenderung lebih cepat (14 hari). Rennet bereaksi pada suhu 32-35°C, sedangkan pengasaman dan koagulasi pada waktu 30-90 menit.

**d. Keju segar.**

Keju segar umumnya memiliki kandungan air 70-86% dan kadar lemak 0-75%. Selama koagulasi asam membutuhkan waktu 16- 48 jam, dan pemanasan pada preparasi 82-88°C. Keju ini tidak mengalami proses ripening. Keju ini juga mudah busuk karena kadar air yang tinggi sehingga masa simpan lebih cepat.

### 7.2.2. Proses Produksi

Proses produksi keju secara umum dapat dipisah menjadi empat tahap, yakni

#### 1. Kultur Starter

Tahap pertama adalah kulturisasi starter pada medium susu dengan membuat medium menjadi asam. Pengasaman pada proses pembuatan keju merupakan tahap penting dalam pembentukan gumpalan dari kasein. Pengasaman juga terkadang dapat membuat aroma tekstur dan rasa dari keju menjadi berbeda dari yang lain.

Bakteri yang umum digunakan dalam proses ini umumnya adalah *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactobacillus*. Terkadang digunakan starter mesofilik seperti *L.lactis* sp. dan *L.lactis* ssp.cremoris yang umumnya menggunakan temperatur di bawah 40<sup>0</sup>C.

Susu dipanaskan agar bakteri asam laktat tersebut memakan laktosa pada susu dan merubahnya menjadi asam laktat. Saat tingkat keasaman meningkat, zat-zat padat dalam susu (protein kasein, lemak, beberapa vitamin dan mineral) menggumpal dan membentuk dadih.

#### 2. Pengentalan

Setelah medium menjadi asam, maka rennet ditambahkan agar protein menggumpal sehingga pada medium akan ditemui dua lapisan yakni lapisan cair (whey) dan lapisan padat (dadih). Whey terkadang dibuang karena memiliki kandungan protein sedikit, atau terkadang direcovery lagi menjadi keju dengan kadar lebih rendah.

Rennet mengandung kumpulan enzim seperti pepsin, dan proteolytic. Rennet mengubah gula dalam susu menjadi asam dan protein yang ada menjadi dadih. Sebagian besar keju menggunakan rennet dalam proses pembuatannya, namun ada alternatif lain sebagai pengganti rennet seperti papain.



Gambar 7.1. Proses pemisahan dadih dari whey

### 3. Pengolahan dadih

Pengolahan dadih berbeda beda bergantung pada jenis keju yang akan dibuat. Untuk membuat keju lunak, dadih dipindahkan ke dalam cetakan. Metode lain adalah memotong dadih agar mengeluarkan lebih banyak whey. Semakin kecil potongan dadih, semakin sedikit whey yang terkandung, keju semakin keras.

Setelah dadih keju mulai terbentuk, maka garam ditambahkan untuk meningkatkan rasa keju agar tidak terasa tawar. Terdapat empat metode pengasinan keju. (i) garam ditambahkan langsung ke dalam dadih (ii) menggosokkan atau menaburkan garam pada bagian kulit keju, metode ini juga berfungsi memperlambat pematangan keju di bagian dalam (iii) keju direndam dalam air garam (iv) mencucui bagian permukaan keju dengan larutan garam. Garam juga berfungsi mengurangi kadar air dalam keju, mengeraskan permukaan, melindungi keju dan mengawetkan ketika memasuki proses pematangan.

### 4. Pematangan

Pematangan atau ripening adalah proses mengubah dadih segar menjadi keju. Pematangan ini disebabkan oleh bakteri atau jamur tertentu yang digunakan selama proses produksi. Proses pematangan keju berada pada kondisi operasi tertentu dan waktu yang bervariasi sesuai kategori keju yang diinginkan.



### 7.3. Sauerkraut

Sauerkraut merupakan makanan populer dari Jerman. Umumnya makanan ini berasal dari kubis yang difermentasi dengan bakteri asam laktat dan diberi garam sebagai penambah rasa. Namun seiring perkembangan jaman, tidak hanya kubis yang digunakan sebagai bahan sauerkraut, bahan lain yang umum digunakan seperti timun, bayam, dan wortel. Di Korea juga dijumpai sauerkraut dengan nama kimchi namun terbuat dari kubis Cina. Umumnya kimchi ditambah beberapa bumbu dan diberi kuah untuk menambah rasa dan aroma (Holzapfel et al., 2008).

#### 7.3.1. Proses Produksi

Proses dasar pembuatan sauerkraut dibagi menjadi 3 tahap, yakni

a. Preparasi bahan baku

Bahan baku sayuran, umumnya kubis, dipisahkan dan dikontrol untuk memperoleh kualitas terbaik. Kontrol yang umum digunakan sebagai parameter adalah warna, kesegaran daun, bebas kontaminasi organisme asing, dan lebih jauh lagi dapat diuji kandungan vitamin C, kandungan nitrat, pestisida, dan sebagainya.

Tabel 7.3. Kondisi awal substrat sayuran untuk fermentasi sauerkraut (Holzapfel et al., 2008)

Parameter	Nilai
Aktivitas air ( $a_w$ )	0,95 – 0.99
pH	5,9-6,5
Suhu	5-20°C
Kandungan gula	20-50g/kg
Kandungan vitamin C	300-700mg/kg
Kapasitas buffer	0,45-0,65 asam laktat / 100gr sayur
Garam dapur	0,6-2,5%

Proses selanjutnya adalah mengupas bagian terluar kubis yang kotor dan agak layu, dan menggunakan bagian daun terdalam sebagai bahan baku. Bahan baku ini

dipotong potong dalam bentuk lebar 0,7 sampai 2 mm. Selanjutnya bahan baku ditambah garam dapur sesuai konsentrasi 1,7-2,3 %

Ringkasan kondisi ekologis substrat yang dibutuhkan untuk kondisi fermentasi sauerkraut dapat dilihat pada Tabel 7.3.

b. Fermentasi

Medium kubis ditambah gula pada konsentrasi tertentu sebagai sumber karbon, dan bakteri asam laktat pada konsentrasi yang telah ditentukan dengan kondisi suhu umumnya adalah suhu kamar, dan waktu yang dibutuhkan 3-12 hari. Selama proses fermentasi, tempat medium berada pada kondisi tertutup sehingga tidak kontak dengan lingkungan luar.

c. Pengepakan

Jika diinginkan produk akhir berupa sauerkraut segar, fermentasi perlu dilakukan lebih lama hingga substrat dalam medium habis. Hal ini untuk menghindari terjadinya produk sekunder karena fermentasi alkoholik.

Namun jika diinginkan produk berupa sauerkraut steril, fermentasi dapat dihentikan setelah pH mencapai di bawah 4,1. Produk kemudian dicuci, dikalengkan dan dipasteurisasi.

7.3.2. Faktor Berpengaruh dalam Fermentasi Sauerkraut

Meski proses produksinya sederhana, fermentasi kubis menjadi sauerkraut berhubungan dengan sistem yang kompleks menyangkut proses mikrobiologis, biokimia, enzimatis, kimia, dan fisika. Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi dapat dilihat pada Tabel 7.4.

1. Penambahan Garam Dapur

Penambahan garam dapur merupakan faktor yang cukup dominan dalam pengaruhnya selama proses fermentasi sauerkraut. Penambahan garam yang tinggi pada medium dapat mempercepat pertumbuhan bakteri asam laktat, namun terkadang diperoleh produk yang tidak diinginkan karena terlalu mengandung banyak asam asetat dan produk metabolik lain. Jika medium ditambahkan sedikit garam (< 8%), fermentasi menjadi terganggu sehingga produk sauerkraut menjadi lebih halus.

Umumnya sauerkraut mengandung 0,6-2% garam dapur. Kandungan ini juga disesuaikan dengan kebutuhan konsumen dan tradisi yang ada di daerah tertentu. Sedangkan di industri besar, penggunaan garam dapur cenderung lebih sedikit karena efek chlorida yang terakumulasi dalam limbah fermentasi.

Tabel 7.4. Faktor berpengaruh pada fermentasi sauerkraut (Holzapfel et al., 2008)

Jenis Faktor	Komponen
Faktor Bahan Baku	Jenis sayuran
	Kualitas sayuran
Faktor Mikrobial	Kualitas dan kuantitas starter
	Kandungan pestisida dan zat berbahaya
	Kandungan kontaminan organisme asing
	Nilai pH
Faktor Teknis	Ukuran dan material fermentor
	Temperatur bahan baku
	Jumlah garam yang ditambahkan
	Kontak oksigen

## 2. Temperatur

Temperatur juga menjadi faktor penting dalam fermentasi sauerkraut. Bakteri asam laktat termasuk grup mesofilik dimana pertumbuhan optimum pada suhu 20-40°C (Defigueiredo & Splittstoesser, 1980). Fermentasi akan berlangsung sangat lambat pada suhu rendah (7,5°C). *L.mesenteroides* dalam waktu 10 hari hanya menghasilkan total asam 0.4% pada suhu rendah. Total asam penting untuk mencegah kebusukan. Jika asam yang dibentuk terlalu sedikit dalam waktu yang lama maka bakteri pembusuk akan tumbuh, sehingga *Lactobacillus* dan *Pediococcus* juga tidak dapat tumbuh dengan baik. Selain terjadi kebusukan, fermentasi tidak dapat berjalan sempurna.

Suhu optimum untuk fermentasi pembentukan asam laktat yaitu pada suhu 18-21°C (Prescott dan Dunn, 1959). Jika suhu dinaikkan menjadi 23°C, maka laju fermentasi lebih cepat, namun asam laktat yang dihasilkan lebih kecil 1-1,5% dalam waktu 8-10 hari. Pada suhu ini, laju tumbuh *Lactobacilli* lebih cepat namun memperlambat

## ***Dasar-dasar Bioproses***

pertumbuhan *Leuconostoc*, di mana bakteri ini diperlukan untuk pengembangan flavour yang khas (Prescott dan Dunn, 1959).

### **7.3.3. Perubahan komposisi**

Kebanyakan sayuran, terutama kubis mengandung serat, karbohidrat, protein, lemak dan mineral yang tinggi. Perubahan yang mungkin terjadi selama proses fermentasi adalah konversi dari karbohidrat menjadi asam laktat dan asam asetat, etil alkohol, karbon dioksida, mannitol, dan dextran. Kandungan lain seperti lipid dan protein juga berubah karena proses fermentasi. Perubahan ini dapat dilihat pada Tabel 7.5.

Tabel 7.5. Perubahan komposisi Sauerkraut (Holzapfel et al., 2008)

<b>Parameter</b>	<b>Kubis Segar</b>	<b>Sauerkraut</b>
Air (g)	90,4	90,7
Nitrogen total (g)	0,22	0,24
Protein (N x 6,25) (g)	1,37	1,52
Lemak (g)	0,2	0,31
Serat terkonsumsi (g)	2,96	2,14
Asam organik (g)	0,23	1,6
Mineral (g)	0,66	2,35
Vitamin C (mg)	48	20
Glukosa (mg)	2039	420
Fruktosa (mg)	1762	210

Perubahan yang terjadi selama proses fermentasi adalah semakin terakumulasinya kandungan laktat di dalam produk dengan rasio antara asam laktat dan asetat 4:1. Kandungan asam lain seperti malat, succinat, dan preponionat juga dapat terbentuk namun dalam jumlah yang kecil. Perubahan komposisi produk dengan perbandingan hari ke-1 dengan hari ke-23 dapat dilihat pada Tabel 7.6.

Tabel 7.6. Perubahan parameter fermentasi sauerkraut hari ke-1 dan ke-23  
(Holzapfel et al., 2008)

Parameter	Hari pertama	Hari ke-23
pH	6,18	3,41
Total keasamaan	0,38 g/kg	12,45 g/kg
Asam laktat D (-)	0,02 g/kg	8,77 g/kg
Asam asetat	0,03 g/kg	3,07 g/kg
Gula tereduksi	38 g/kg	5,8 g/kg
Garam dapur	17,4 g/kg	17,5 g/kg

Sauerkraut merupakan produk olahan hasil fermentasi yang menyehatkan karena mengandung banyak mineral, dan vitamin (terutama vitamin C), selain itu bakteri asam laktat yang ada di saeurkraut juga dapat menopang fungsi pencernaan di dalam tubuh.



(a)



(b)

Gambar 7.2. Proses pembuatan Saeurkraut skala besar (a) sortir kubis (b) kubis yang dicacah sebelum masuk fermentor

#### 7.4. Kecap

Kecap adalah salah satu jenis makanan hasil fermentasi dari protein hewani atau nabati yang digunakan sebagai penambah rasa atau penyedap makanan. Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI 01-3543-1994), kecap kedelai adalah produk cair yang diperoleh dari hasil fermentasi dan atau cara kimia (hidrolisis) kacang kedelai (*Glycine max* L) dengan atau tanpa penambahan bahan makanan lain dan bahan tambahan yang

## ***Dasar-dasar Bioproses***

diizinkan. Kecap dikenal secara luas oleh masyarakat Indonesia sebagai produk semacam saus dari kedelai dengan konsistensi cair, berwarna coklat gelap dan beraroma daging.

Pembuatan kecap di Indonesia pada umumnya dilakukan secara fermentasi. Fermentasi terdiri dari dua tahap, yaitu fermentasi kapang (solid state fermentation) dan fermentasi dalam larutan garam (brine fermentation). Pada fermentasi kapang, mikroba yang berperan antara lain *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. niger* dan *Rhizopus oligosporus*. Sedangkan selama fermentasi garam, berperan beberapa jenis jamur dan bakteri antara lain *Zygosachmomyces*, *Hausmulla* dan *Lactobacillus* sp.

### **7.4.1. Klasifikasi Kecap**

Peggy et al. (2008) menyatakan bahwa berdasarkan cara pembuatan dan bahan baku yang digunakan, umumnya kecap dibedakan menjadi tiga jenis, (i) kecap terfermentasi (ii) kecap formulasi (iii) dan kecap variasi. Kecap fermentasi merupakan kecap yang paling sering dijumpai di pasaran, yang diproduksi melalui proses fermentasi secara alami atau terkontrol dengan teknologi modern, sementara kecap formulasi adalah campuran antara kecap fermentasi dengan larutan asam terhidrolisis dari tanaman berprotein tinggi. Kecap formulasi juga memiliki nilai jual yang lebih murah dan proses produksi yang lebih singkat, namun rasa dan nilai gizi yang diberikan lebih rendah dari kecap fermentasi. Berbeda lagi dengan kecap variasi, yakni kecap yang diolah dengan proses fermentasi dengan penambahan bumbu tertentu seperti jamur tiram, rumput laut, dan bumbu lain.

Kecap juga dapat dibedakan berdasarkan warnanya, yakni kecap putih dan kecap merah. Kecap putih biasanya difermentasi dengan suhu rendah dan waktu yang lebih lama sehingga menghasilkan aroma dan rasa yang lebih baik. Sedangkan kecap merah, kecap yang biasa dijumpai di pasaran, memiliki warna yang lebih gelap karena terjadi karamelisasi produk. Kecap merah banyak digunakan untuk memberi warna tertentu dan sebagai penyedap pada makanan yang diinginkan seperti nasi goreng.

### **7.4.2. Teori Fermentasi**

Fermentasi berasal dari kata “fervere” yang berarti mendidih. Hal ini terjadi pada gejala fermentasi yang terlihat gelembung udara yang merupakan akibat katabolisme

anaerob yang menghasilkan CO<sub>2</sub>. Mulanya fermentasi digunakan untuk menunjukan proses perubahan glukosa menjadi alkohol yang berlangsung anaerob, kemudian berkembang menjadi seluruh perombakan senyawa organik yang dilakukan mikroorganisme yang melibatkan enzim yang dihasilkannya. Produk fermentasi dapat digolongkan menjadi 4 jenis yaitu produk biomassa, produk enzim sintesis, produk metabolit primer serta produk transformasi.

Langkah Fermentasi terdiri atas 4 (empat) tahap yaitu:

1. Penjamuran

Pada tahap ini, bahan yang sudah dibersihkan direbus, kemudian direndam semalam. Setelah direndam, kedelai dicuci dan dikupas kulitnya, kadang-kadang dilanjutkan dengan perebusan yang kedua untuk menghilangkan bakteri patogen serta melunakkan isi kedelai. Bahan kemudian dicampur dengan tepung tapioka yang telah disangrai lalu dibiarkan pada suhu ruang beberapa hari sampai ditumbuhi kapang. Pada beberapa pengrajin sering penambahan tepung ini tidak dilakukan dan kedelai yang telah bersih tadi dibiarkan pada suhu ruang sampai ditumbuhi kapang. Kemudian bahan yang telah ditumbuhi kapang tersebut dikeringkan untuk di proses lebih lanjut (Suprihatin,2010).

2. Fermentasi Larutan Garam

Hasil Penjamuran direndam dengan larutan garam untuk proses selanjutnya. Perendaman dengan garam difungsikan untuk membutuh mikroorganisme yang tidak diinginkan serta menarik keluar nutrien yang ada di kedelai untuk sumber nutrisi mikroorganisme yang tahan terhadap garam.

3. Pemasakan

Pada pembuatan kecap tradisional di Indonesia, setelah proses perendaman selesai maka dilanjutkan dengan proses pemasakan. Pemasakan dilanjutkan sampai diperoleh produk dengan konsistensi tertentu (agak kental). Pada tahap pemasakan ini pula dilakukan penambahan bumbu-bumbu seperti daun salam, pekak, dan lain-lainnya.

4. Analisis kadar protein terlarut

Analisis kadar protein terlarut dilakukan dengan metode kjeldahl. Jenis analisis ini dilakukan karena selama fermentasi kadar analisis protein terlarut bertambah (Nugraheni, 2008).

7.4.3. Fermentasi dalam Kecap

Untuk bahan baku kedelai, mula-mula kedelai difermentasi oleh kapang (*Aspergillus sp* dan *Rhizopus sp*) menjadi semacam tempe kedelai, kemudian “tempe” ini dikeringkan dan direndam di dalam larutan garam.

Garam merupakan senyawa yang selektif terhadap pertumbuhan mikroba. Hanya mikroba tahan garam saja yang tumbuh pada rendaman kedelai tersebut. Mikroba yang tumbuh pada rendaman kedelai pada umumnya dari jenis khamir dan bakteri tahan garam, seperti *Zygosaccharomyces* (khamir) dan *Lactobacillus* (bakteri). Mikroba ini merombak protein menjadi asam-asam amino dan komponen rasa, aroma, serta menghasilkan asam. Fermentasi tersebut terjadi jika kadar garam cukup tinggi, yaitu antara 15 sampai 20% (Tarwiyah, 2001).

7.4.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi

Beberapa faktor yang mempengaruhi kualitas kecap selama fermentasi adalah:

1. Mikroba

Mikroba dalam industri fermentasi merupakan faktor utama, sehingga harus memenuhi syarat-syarat tertentu yaitu :

a. Murni

Dalam proses tertentu harus menggunakan biakan murni (dari satu strain tertentu) yang telah diketahui sifat-sifatnya . untuk menjaga agar biakan tetap murni dalam proses maka kondisi lingkungan harus dijaga tetap steril. Penggunaan kultur tunggal mempunyai resiko yang tinggi karena kondisi harus optimum. Untuk mengurangi kegagalan dapat digunakan biakan campuran. Keuntungan penggunaan biakan campuran adalah mengurangi resiko apabila mikroba yang lain tidak aktif melakukan fermentasi. Dalam bidang pangan penggunaan biakan campuran dapat menghasilkan aroma yang spesifik.



b. Unggul

Pada kondisi fermentasi yang diberikan, mikroba harus mampu menghasilkan perubahan-perubahan yang dikehendaki secara cepat dan hasil yang besar. Sifat unggul yang ada harus dapat dipertahankan. Hal ini berkaitan dengan kondisi proses yang diharapkan. Proses rekayasa genetik dapat dilakukan untuk memperbaiki sifat jasad dengan maksud mempertinggi produk yang diharapkan. Keunikan karakteristik kecap ikan adalah rasanya yang asin dan berbau ikan.

2. Suhu

Suhu selama proses fermentasi sangat menentukan jenis mikroorganisme dominan yang akan tumbuh. Umumnya diperlukan suhu  $30^{\circ}\text{C}$  untuk pertumbuhan mikroorganisme. Bila suhu kurang dari  $30^{\circ}\text{C}$  pertumbuhan mikroorganisme penghasil asam akan lambat sehingga dapat terjadi pertumbuhan produk.

3. Oksigen (kondisi aerob/ anaerob)

Ketersediaan oksigen harus diatur selama proses fermentasi. Hal ini berhubungan dengan sifat mikroorganisme yang digunakan. Untuk bakteri-bakteri penghasil asam tidak membutuhkan oksigen selama proses fermentasi berlangsung.

4. Kandungan air medium/ substrat

Kadar optimum tergantung pada substrat, organisme dan produk akhir. Kisaran kadar air yang optimal adalah 50-75%. Kadar air yang tinggi akan mengakibatkan penurunan porositas, pertukaran gas, difusi oksigen, volume gas, tetapi meningkatkan resiko kontaminasi dengan bakteri.

5. Nilai pH medium (awal fermentasi)

Nilai pH menunjukkan derajat keasaman suatu bahan, dimana pH merupakan konsentrasi ion hidrogen yang terdapat di dalam larutan. pH adalah faktor kimia yang sangat mempengaruhi keawetan makanan atau bahan makanan, dimana mikroba-mikroba hanya dapat hidup dan berkembang biak dalam lingkungan dengan kondisi pH tertentu.

6. Kandungan nutrisi

Kandungan medium yang akan difermentasi juga menentukan hasil akhir dari proses fermentasi. Nutrisi ini juga berkaitan dengan nutrisi makro dan mikro.

## ***Dasar-dasar Bioproses***

Nutrisi juga mempengaruhi kualitas produk kecap yang terbentuk, termasuk kekentalan, aroma, rasa, dan teksturnya.

### **7. Konsentrasi garam**

Konsentrasi garam yang dianjurkan adalah 5-15%. Garam berfungsi untuk menghambat pertumbuhan jenis-jenis mikroorganisme pembusuk yang tidak diinginkan selama proses fermentasi berlangsung. Prinsip kerja garam dalam proses fermentasi adalah untuk mengatur  $A_w$  (ketersediaan air untuk kebutuhan mikroorganisme). Mikroorganisme yang diinginkan untuk tumbuh adalah jenis-jenis bakteri penghasil asam. Selain mengatur  $A_w$ , garam juga berfungsi untuk menarik keluar cairan sel jaringan yang mengandung sakarida-sakarida, dimana sakarida tersebut merupakan nutrisi untuk pertumbuhan mikroorganisme. Kadar garam selama fermentasi akan berubah karena cairan dalam sel-sel jaringan tertarik keluar sel, karena itu secara periodik harus diadakan penyesuaian kadar garam. (Nurfatimah,2012).

## DAFTAR PUSTAKA

- Allan, C.S. 1997. *Fermentation design*. In: Vogel, H.C., and Todaro, C.L. 1997. *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment*. 2<sup>nd</sup> Ed. Noyes Publication. New Jersey.
- Briggs, G.E. and J.B.S. Haldane. 1925. A note on the kinetic of enzyme action. *Biochem. j.* 19: 338-339.
- Carberry, J.J. 1976. *Chemical and catalytic reaction engineering*. McGraw Hill. New York.
- Charm, S.E. and B.L., Wong. 1970. Enzyme inactivation with shearing. *Biotechnol. Bioeng.* 12: 1103-1109.
- Congress Biotechnologi USA. 1984. *Commercial biotechnology: an international analysis*. p.589. Office of technology assesment. Washington.
- Daulay, D dan Rahman, A. 1988. *Teknologi Fermentasi Sayuran dan Buah-buahan*. Laboratorium Mikrobiologi pangan, PAU Pangan dan Gizi, IPB.
- Defigueireo, H. P. dan D. F. Splittstoesser. 1980. *Food Microbiology*. AVI publ. co., Wetport, Conecticut.
- Dutta, Ravij. 2008. *Fundamental of Biochemical Engineering*. Springer B.H. New York.
- Eadie, G.S. 1942. The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmmme. *J. Biol. Chem.* 146: 85-93.
- Eveleigh, D.E. 1981. The microbiological production of industrial chemicals. *Scientific American*. 245:155-178.
- Ghasem, D.N. 2007. *Biochemical engineering and biotechnology*. Elsevier. Netherland.
- Gutcho, S.J. 1974. *Immobilized enzymes: preparation and engineering techniques*. Noyes data corp. Park Ridge, New Jersey.
- Harada, Y., Sakata, K., Sato, S., and Takayama, S. 1997. *Fermentation pilot plant*. In: Vogel, H.C., and Todaro, C.L. 1997. *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment*. 2<sup>nd</sup> Ed. Noyes Publication. New Jersey.

## ***Dasar-dasar Bioproses***

- Hofstee, B.H.J. 1952. Specificity of esterases: I. Identification of two pancreatic aliesterases. *J. Biol. Chem.* 199:357-364.
- Holzapfel, W., Ulrich, S., and Herbert, B. 2008. *Sauerkraut*. in: Farnworth, E.R.2008.*Handbook of fermented functional foods*. 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press. USA.
- Jashbhani, B., Prajapati, and Nair, B.M. 2008. *The history of fermented foods* in: .Farnworth, E.R.2008.*Handbook of fermented functional foods*. 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press. USA.
- Johnson, M.J. 1971. *Fermentation: yesterday and tomorrow*. 1<sup>st</sup> Ed. ChemTech. USA.
- Jones, E.O. and J.M. Lee. 1988. Kinetic analysis of biocoverion of cellulose in attrition bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 35-40.
- Knut J.H., Wilhelm, B., J. Schrezenmeir, and Michael, deVrese. *Cheese and its potential as prebiotic food*. In: Farnworth, E.R.2008.*Handbook of fermented functional foods*. 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press. USA
- Michaelis, L. and M.I. Menten. 1913. Die kinetik der invertinwirkung. *Bio-chem.Zeitschr.*49:333-369.
- Nugraheny, M. 2008. “*Teknologi Pemanfaatan Limbah Padat Industri Tahu Untuk Pembuatan Kecap Ampas Tahu*”. PTBB Fakultas Teknik Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.
- Nurfatimah. 2012.*Fermentasi Pada Pembuatan Kecap Ikan*. UIN Sunan Gunung Djati. Bandung.
- Pauline, M.D. 1995. *Bioprocess engineering principles*. Academic Press. London.
- Pederson, C.S. and Albury, M.N. 1969. *The Sauerkraut Fermentation*. in K.H. Steinkraus. 1983. *Handbook of Indigenous Fermented Food*. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.
- Peggy, H.Y-H., Steven P., and Li, Jiangrong. 2008. *Traditional Chinese Fermented Foods*. in: Farnworth, E.R.2008.*Handbook of fermented functional foods*. 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press. USA.
- Prescott, S.C. and Dun, C.G. 1959. *Industrial Microbiology*. Mc Graw Hill Book Co., London.

- Radiyati, T. 2002. *Teknologi Pembuatan Kecap Kedelai*. Badan Pemberdayaan Masyarakat. Jakarta.
- Salle, A.J. 1948. *Fundamental Principle of Bacteriology*. Mc Graw Hill Book Co. Inc. New York, Toronto.
- Sediadi. A. 2000. *TTG Pengolahan Pangan*. Kantor Deputi Menengristek Bidang pendayagunaan dan pemasyarakatan ilmu pengetahuan dan teknologi: Jakarta
- Soekarto, S.T. 1985. *Penilaian Organoleptik untuk Industri Pangan dan Hasil Pertanian*. Jakarta: Bhratara Karya Aksara
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., and Hall, S.J. 2003. *Principles of fermentation technology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Butterworth-Heinemann, Burlington.
- Standar Nasional Indonesia (SNI). 1994. *Kecap Kedelai*. Jakarta : Pusat Standarisasi Industri. Departemen Perindustrian. (SNI 01-3543-1994).
- Steinkraus, K.H. 1983. *Handbook of Indogenous Fermented Food*. Marcel Dekker, Inc. Dover publ. Inc., New York.
- Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. UNESA University Press, Semarang.
- Tarwiyah, Kemal. 2001. *Kecap*. Dewan Ilmu Pengetahuan, Teknologi dan Industri. Sumatera barat.
- Thomas, C.R. and P. Dunnill. 1979. Action of shear on enzymes: studies with catalase and urease. *Biotechnol Bioeng*.21: 2279-2302.
- Willem, H.K. 1997. *Nutritional requirements in fermentation process*. In: Vogel, H.C., and Todaro, C.L. 1997. *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment*. 2<sup>nd</sup> Ed. Noyes Publication. New Jersey.
- Wiseman, A. and B.J. Gould. 1970. *Enzyme: their natural and role*. Hutchingson Educational. UK.
- Zaborsky, O. 1973. *Immobilized enzymes*. CRC Press. Cleveland.